N° d'ordre : 361

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S.
A. O. 5480

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Michel AVIGNON
Ingénieur - Chimiste E.N.S.C.B.
Licencié ès Sciences Physique

CONTRIBUTION A L'ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES DIPEPTIDES DANS DIFFÉRENTS ÉTATS PHYSIQUES

Soutenue le 16 Juin 1972 devant la Commission d'examen :

MM.	A. PACAULT,	Membre correspondant de l'Institut, Professeur	*Président*
	B. PULLMAN,	Professeur à l'Université de Paris VI	*Examinateurs*
	J. NEEL,	Professeur à l'Université de Nancy	
	P. BOTHOREL,	Professeur	
	J. LASCOMBE,	Professeur	
Mlle	C. GARRIGOU-LAGRANGE,	Maître de Recherches	
M.	P.V. HUONG,	Maître de Recherches	

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547317_0026

N° d'ordre : 361

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S.
A. 0. 5480

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Michel AVIGNON
Ingénieur - Chimiste E.N.S.C.B.
Licencié ès Sciences Physique

CONTRIBUTION A L'ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES DIPEPTIDES DANS DIFFÉRENTS ÉTATS PHYSIQUES

Soutenue le 16 Juin 1972 devant la Commission d'examen :

MM.	A. PACAULT,	Membre correspondant de l'Institut, Professeur	*Président*
	B. PULLMAN,	Professeur à l'Université de Paris VI	*Examinateurs*
	J. NEEL,	Professeur à l'Université de Nancy	
	P. BOTHOREL,	Professeur	
	J. LASCOMBE,	Professeur	
Mlle	C. GARRIGOU-LAGRANGE,	Maître de Recherches	
M.	P.V. HUONG,	Maître de Recherches	

1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents,

A ma femme.

Actuellement et plus que jamais, un travail de recherche est une oeuvre collective. Celui-ci s'inscrit dans le cadre des recherches coopératives sur programme relatives à l'étude des structures moléculaires de composés d'intérêt biologique (RCP n° 195).

Je désire avant tout exprimer ma très profonde reconnaissance à Monsieur LASCOMBE, Professeur à l'Université de Bordeaux I, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et assurer la direction de cette thèse dont il m'a proposé le sujet. Il a su constamment me faire bénéficier de ses encouragements, de ses conseils et de son appui chaleureux.

Je sais gré à Monsieur le Professeur PACAULT, membre correspondant de l'Institut,de m'avoir permis de poursuivre mes recherches dans les laboratoires du Centre de Recherches Paul Pascal qu'il dirige. Il m'a toujours témoigné un soutien bienveillant et a accepté de présider mon jury de thèse.

Mademoiselle GARRIGOU-LAGRANGE et Monsieur PHAM VAN HUONG, maîtres de recherche au C.N.R.S., ont plus spécialement suivi l'élaboration de ce travail et contribué, pour une large part, à ma formation de chercheur. Qu'ils veuillent bien trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur BOTHOREL pour l'aide précieuse et les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer, particulièrement lors des études effectuées sous sa direction par Diffusion Rayleigh Dépolarisée

Monsieur PULLMAN, Professeur à l'Université de PARIS VI, m'a fait l'honneur de venir juger cette thèse. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mes remerciements respectueux.

Je remercie Monsieur NEEL, Professeur à l'Université de NANCY, et responsable de la RCP n° 195, pour le vif intérêt avec lequel il a suivi la progression de mes travaux. Je lui suis également reconnaissant d'avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury de thèse.

L'aboutissement de ces recherches n'aurait pas été possible sans l'étroite collaboration des chercheurs et des techniciens du Centre de recherche Paul Pascal, du Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et de la RCP n° 195. Dans cet esprit, je tiens à exprimer plus particulièrement

mes sincères remerciements à Madame JOUSSOT DUBIEN, Mademoiselle BELLOCQ ainsi qu'à Messieurs MARRAUD, GRENIE et MAIGRET.

Enfin, il m'est très agréable de remercier bien amicalement Madame CAZAUX et Monsieur MOINEAU pour le soin et la diligence qu'ils ont apportés à la réalisation technique de ce mémoire.

CONTRIBUTION A L'ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES DIPEPTIDES DANS DIFFERENTS ETATS PHYSIQUES

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

ANALYSE CONFORMATIONNELLE THEORIQUE DES SYSTEMES PEPTIDIQUES :
GENERALITES ET APPLICATION AUX DIPEPTIDES CH_3-CONH-CHR_1-CONH-CH_3 5 à 36

CHAPITRE 1 : NOTATIONS ET CONVENTIONS

1.1.1. : Acides α - aminés 9

1.1.2. : Dipeptides 11

CHAPITRE 2 : CALCUL CONFORMATIONNEL DES DIPEPTIDES : ANALYSE DES METHODES

1.2.1. : Approximation des sphères incompressibles ("Hard Sphere") 14

1.2.2. : Méthode des potentiels d'interaction 15

1.2.3. : Méthodes quantiques globales 22

CHAPITRE 3 : PRESENTATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

1.3.1. : Dipeptides de la glycine 34

1.3.2. : Dipeptides de l'alanine 34

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA CONFORMATION DES DIPEPTIDES CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 EN
MILIEU INERTE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE 37 à 72

CHAPITRE 1 : CONFORMATION DES DIPEPTIDES EN SOLUTION DILUEE DANS LE TETRACHLORURE DE CARBONE

2.1.1. : Liaisons hydrogène intramoléculaires : mise en évidence des conformations chélatées 43

2.1.2. : Influence de la chaîne latérale et du groupement terminal sur la fréquence des vibrateurs ν(N-H) libres 47
2.1.3. : Position de la chaîne latérale et du groupement terminal par rapport au squelette peptidique 49
2.1.4. : Comparaison de nos résultats expérimentaux avec ceux des calculs conformationnels théoriques 50

CHAPITRE 2 : CONFORMATION DES DIPEPTIDES ISOLES EN MATRICE D'ARGON
2.2.1. : Méthode d'analyse des spectres infrarouges des dipeptides en matrice d'argon 53
2.2.2. : Résultats expérimentaux et attributions 55
2.2.3. : Discussion des résultats 65

CHAPITRE 3 : DOSAGE DES FORMES "ETENDUE" (C_5) ET "REPLIEE"(C_7)
2.3.1. : Principe de la méthode 67
2.3.2. : Application de la méthode 69
2.3.3. : Discussion des résultats 71

TROISIEME PARTIE

ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES DIPEPTIDES EN SOLUTION AQUEUSE 73 à 109

CHAPITRE 1 : GENERALITES ET MISE AU POINT DE LA METHODE
3.1.1. : Généralités sur la Diffusion Rayleigh Dépolarisée 77
3.1.2. : Détermination des polarisabilités optiques principales du groupement amide O⋯C⋯N 79
3.1.3. : Etude de la conformation du groupe éthyle dans le N-éthylacétamide en solution aqueuse 83

CHAPITRE 2 : DETERMINATION DES ANGLES ϕ ET ψ DE A Gly MA et A Ala MA : CONFORMATION DU SQUELETTE DIPEPTIDIQUE
3.2.1. : Interprétation des spectres Raman des dipeptides 91
3.2.2. : Etude comparative de la réfraction molaire des alkylacétamides et des dipeptides 97
3.2.3. : Méthode de "perturbation d'anisotropie" 99
3.2.4. : Application de la méthode 100
3.2.5. : Discussion des résultats 104

CONCLUSION 111

PARTIE EXPERIMENTALE 115

BIBLIOGRAPHIE 119

INTRODUCTION

La relation entre l'activité spécifique d'une protéine et sa structure constitue l'un des concepts de base de la biologie moléculaire moderne. Cette idée a ouvert un extraordinaire champ de recherche aux physicochimistes tant théoriciens qu'expérimentateurs. Il s'agit en fait de définir la nature et les caractéristiques des forces qui déterminent la conformation native d'une protéine et, à partir de là, son mode d'action en fonction des perturbations du milieu environnant.

On connait d'ores et déjà plusieurs éléments de la réponse à cette question fondamentale. PAULING a été le premier à souligner le rôle prédominant d'un petit nombre de conformations régulières stabilisées par liaisons hydrogène dans l'établissement de la structure secondaire des protéines (1). Une autre étape importante a été franchie lorsque KENDREW, PERUTZ et coll.(2, 3) ont publié leurs travaux déterminant par diffraction des rayons X les structures détaillées des cristaux hydratés de myoglobine et d'hémoglobine. Enfin, les expériences d'ANFINSEN et coll.(4) ont apporté la preuve que la conformation native d'une protéine est une propriété d'équilibre déterminée à la fois par les caractéristiques physicochimiques de la structure primaire de la chaîne polypeptidique et par ses interactions avec le solvant plutôt que par les conditions particulières de sa biosynthèse. Néanmoins, la grande complexité chimique et structurale des protéines a conduit de nombreux chercheurs à s'orienter vers l'étude de substances modèles considérées comme des répliques simplifiées de ces molécules.

Un premier point de vue consiste à analyser les caractéristiques conformationnelles et les propriétés thermodynamiques des polypeptides en fonction de la nature de leur environnement et de la température. Les travaux théoriques et expérimentaux ayant trait au phénomène de transition hélice-pelote témoignent du grand intérêt de ce type d'approche. Toutefois, les interactions spécifiques ne peuvent pas toujours être dégagées des propriétés globales observées.

L'étude des caractéristiques physicochimiques de molécules simples reproduisant les fragments élémentaires des protéines constitue un autre centre

d'intérêt. C'est dans cette optique que se situe notre travail. Nous avons, en effet, entrepris l'analyse conformationnelle expérimentale des dipeptides de formule générale CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 en fonction de leur état physique et de la nature des chaînes latérales R_1 et R_2. Ces dipeptides sont connus depuis longtemps comme de bons modèles pour analyser les propriétés des résidus amino-acides (HN-CHR_1-CO) tels qu'ils apparaissent dans un enchaînement polypeptidique. Ils présentent, en outre, l'avantage d'être solubles à la fois dans l'eau et dans quelques solvants organiques quasi-inertes : il est donc possible de simuler l'environnement des différents résidus dans les zones hydrophiles et hydrophobes de la protéine en milieu biologique. Enfin, ils se prètent parfaitement aux expériences nécessitant l'utilisation conjointe de plusieurs méthodes physicochimiques.

On dispose à l'heure actuelle d'une abondante littérature relative à l'analyse conformationnelle théorique des dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-CH_3. Pour la plupart, les auteurs ont essentiellement cherché à calculer a priori l'énergie des molécules isolées en fonction de leur géométrie. Les résultats de ces calculs dépendent en général de la méthode utilisée : il semble en effet que les divergences puissent provenir d'une part du choix des approximations permettant la mise en équation de l'énergie conformationnelle et d'autre part de la paramétrisation utilisée lors du calcul.

Les données expérimentales concernant les dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 étaient, quant à elles, peu nombreuses avant le début de ce travail. MIZUSHIMA et coll. avaient publié une série d'articles consacrés à l'interprétation du massif d'absorption infrarouge correspondant aux vibrations de valence ν(N-H) de quelques-uns de ces composés en solution dans le tétrachlorure de carbone (5 à 10).

Cependant, leurs attributions nous ont semblé discutables ainsi que les conformations auxquelles ils aboutissent. Plus récemment, BYSTROV et coll. ont repris et appliqué les résultats de MIZUSHIMA à un dérivé plus complexe ($R_1 = CH_3$, $R_2 = CH(CH_3) - COOCH_3$) en solution dans le tétrachlorure de carbone et le chloroforme et ont été conduits à formuler des conclusions analogues en utilisant la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire (11, 12).

Compte tenu de la nature des informations que l'on peut espérer obtenir sur les dipeptides et de la relative imprécision des résultats expérimentaux cités précédemment, nous avons repris de manière systématique l'étude des conformations de ces molécules isolées dans un milieu quasi-inerte. C'est en effet la seule possibilité dont on dispose pour minimiser l'influence des forces intermoléculaires lorsqu'il est impossible comme ici d'obtenir les composés à l'état gazeux. Nous avons ensuite cherché à déterminer l'influence de la polarité du solvant sur la conformation en considérant plus particulièrement l'exemple des solutions aqueuses dont il est inutile de souligner l'intérêt dans le cas des systèmes

peptidiques.

Nous nous proposons de développer ces différents points dans le présent mémoire pour lequel nous avons adopté un plan en trois parties.

Nous présenterons dans une première partie une mise au point concernant les fondements de l'analyse conformationnelle théorique des systèmes peptidiques et nous discuterons les méthodes qui permettent le calcul des énergies des dipeptides ainsi que les principaux résultats actuellement connus. La deuxième partie sera consacrée à notre étude par spectroscopie infrarouge des conformations adoptées par les dipeptides en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone et isolés à basse température en matrice d'argon. Nous exposerons enfin dans une troisième partie les résultats de notre analyse conformationnelle des dipeptides en solution aqueuse obtenus conjointement par Diffusion Rayleigh Dépolarisée (D.R.D.) et spectroscopie Raman.

PREMIERE PARTIE

ANALYSE CONFORMATIONNELLE THEORIQUE DES SYSTEMES PEPTIDIQUES : GENERALITES ET APPLICATION AUX DIPEPTIDES CH_3-CONH-CHR_1-CONH-CH_3

INTRODUCTION

La première étape du calcul des états conformationnels d'un système peptidique en milieu biologique consiste généralement à évaluer l'énergie de la molécule isolée en fonction de sa géométrie. Les dipeptides ont été, dans cet esprit, largement étudiés. Aussi nous a-t-il semblé nécessaire, avant d'entreprendre l'exposé de nos résultats expérimentaux, de faire une mise au point des connaissances théoriques actuelles dans ce domaine. Cette analyse constitue l'essentiel de notre première partie. Nous présenterons tout d'abord (chapitre 1) les notations et conventions en usage pour décrire les systèmes peptidiques. Nous exposerons ensuite (chapitre 2) le principe des différentes méthodes de calcul des énergies conformationnelles. Nous comparerons enfin, dans le cas de quelques dipeptides (chapitre 3), les résultats obtenus suivant le type de calcul utilisé.

NOTATIONS ET CONVENTIONS

Les notations et conventions que nous utiliserons au cours de ce mémoire pour décrire les conformations moléculaires des dipeptides correspondent à celles qui sont actuellement recommandées par la commission de nomenclature biochimique IUPAC-IUB (13). Nous en avons résumé l'essentiel dans le présent chapitre pour éviter de devoir se reporter sans cesse à la publication originale.

111 - ACIDES α- AMINES

Les acides α - aminés correspondent à la formule générale $H_2N\text{-}CHR_1\text{-}COOH$. Ces composés diffèrent les uns des autres par la nature chimique du radical R_1 - appelé habituellement "chaîne latérale" - branché sur l'atome de carbone central (C_α). Excepté lorsque $R_1 = H$, l'atome C_α est asymétrique. Par conséquent, un acide α - aminé est susceptible de présenter deux **isomères** optiques notés D (Dextrogyre) et L (Levogyre) possédant la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière respectivement vers la droite et vers la gauche.

La configuration absolue des liaisons autour de l'atome C_α a pu être déterminée dans les deux cas par diffraction des rayons X (figure 1).

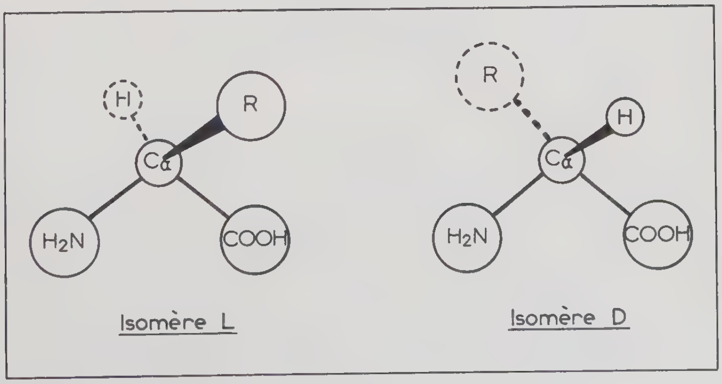


Fig. 1 : Représentation schématique des deux isomères optiques d'un α - amino acide.

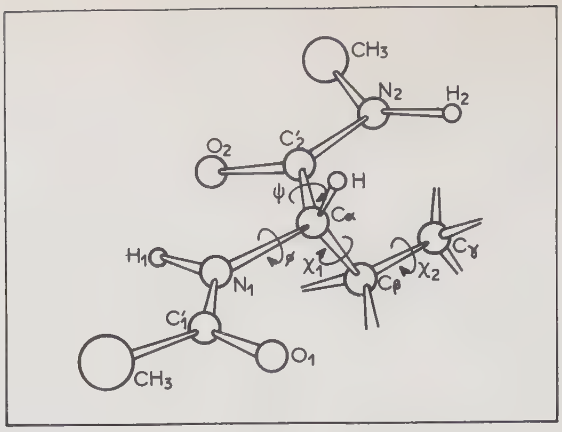


Fig. 2 : Symboles et notations en usage pour décrire un dipeptide.

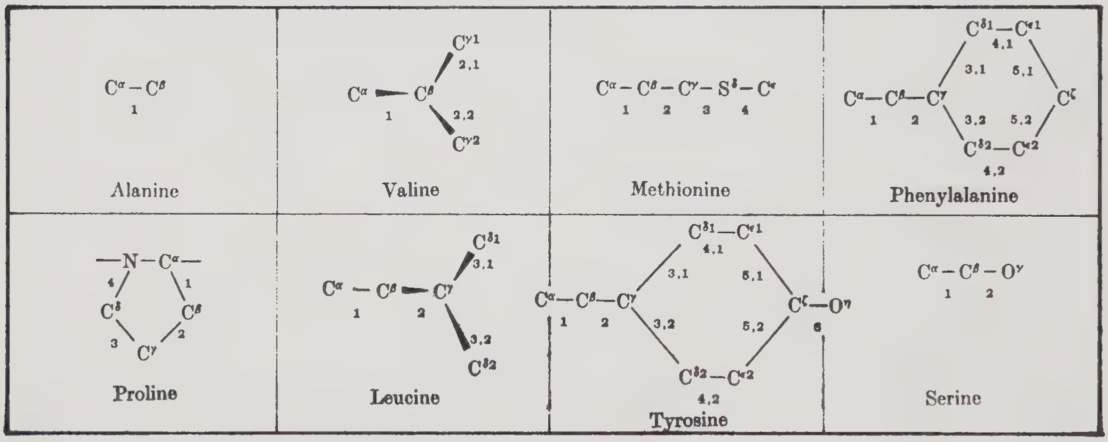


Fig. 3 : Représentation simplifiée de quelques chaînes latérales R_1.

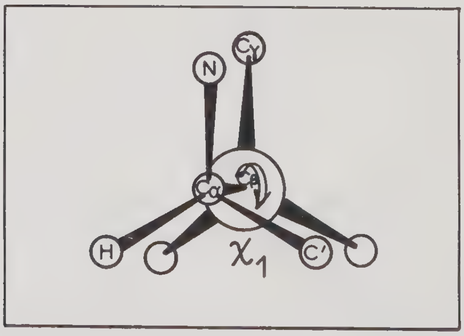


Fig. 4 : Projection de Newman d'une chaîne latérale dans la conformation origine (χ_1 = 0) et définition du sens de la rotation autour de la simple liaison C_α - C_β.

Etant donné que les vingt acides α - aminés couramment rencontrés dans le milieu vivant sont toujours en configuration L, toutes les notations et conventions qui vont suivre se réfèrent à des enchaînements constitués d'isomères L.

112 - DIPEPTIDES

Les dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 peuvent être considérés comme dérivant d'un acide α - aminé par acétylation de la fonction amine et alkylaminolyse de la fonction acide carboxylique. Leurs noms ainsi que leurs notations abrégées découlent d'un tel schéma réactionnel. Ainsi, par exemple, le dipeptide CH_3-CONH-CH_2-CONH-C_2H_5 provenant de l'éthylaminolyse de la N-acétylglycine (R_1 = H) portera le nom condensé d'acétylglycine N-éthylamide (A Gly EA) ; de la même manière, le dipeptide CH_3-CONH-CH(CH_3)-CONH-CH_3 (R_1 = CH_3) sera noté acétylalanine N-méthylamide (A Ala MA).

Nous avons rassemblé sur la figure 2 les différents symboles utilisés pour décrire la géométrie de ces molécules. Ces notations sont définies et commentées ci-après.

A) Squelette peptidique

Désignation des atomes et groupes d'atomes

Les atomes de carbone sont notés respectivement C_α et C' suivant qu'ils sont porteurs de la chaîne latérale ou qu'ils appartiennent aux groupes carbonyles. Le terme "résidu" est réservé à l'enchaînement au sens chimique provenant en bloc de l'acide α - aminé, c'est-à-dire (HN-CHR_1-CO), tandis que le terme "unité peptidique" utilisé généralement dans les travaux théoriques, se réfère à la séquence rigide [C_α - CONH]. Enfin, le motif fonctionnel - CONH - est souvent appelé "groupe peptide".

Longueurs de liaisons

La longueur de la liaison A-B est notée b(A, B).

Angles de liaisons

L'angle de liaison intérieur aux trois atomes A, B, C entre la liaison A-B et la liaison B-C est écrit τ(A, B, C).

Angles de torsion

Les rotations autour des simples liaisons N-C_α et C_α-C' sont notées respectivement Φ et ψ. Ces angles sont positifs pour une rotation à droite, c'est-à-dire lorsque les liaisons issues de l'atome terminal tournent dans le sens des aiguilles d'une montre si l'on oriente l'axe de rotation de N vers C_α ou de C_α vers C'. Ainsi, la conformation totalement étendue est associée aux angles $\Phi = \pm 180°$ et $\psi = \pm 180°$. Cette convention correspond à un changement d'origine de + 180° par rapport à celle proposée par EDSALL et coll.(14).

Les cartes conformationnelles permettant de visualiser les propriétés P de la forme $P = f(\Phi, \psi)$ seront représentées suivant des diagrammes carrés comportant Φ en abscisse et ψ en ordonnée.

B) Chaînes latérales

Notation des atomes

Les lettres de l'alphabet grec sont utilisées en indice du symbole de l'atome considéré ; on y ajoute les nombres 1 ou 2 dans le cas des chaînes ramifiées. A titre d'exemple, nous avons représenté (fig. 3) quelques chaînes latérales parmi lesquelles figurent celles dont nous reparlerons au cours de ce travail.

Angles de torsion

Dans le cas des chaînes non ramifiées, on appelle χ_j l'angle de rotation autour de la Jème liaison avec J = 1 pour la liaison $C_\alpha - C_\beta$ (χ_1), J = 2 pour la liaison $C_\beta - C_\gamma$ (χ_2) etc.. Dans le cas des chaînes ramifiées, on peut utiliser en outre les indices 1 et 2 pour préciser la ramification considérée (χ_{J_1} ou χ_{J_2}).

Le sens des rotations est défini de la même manière que dans le cas du squelette. Lorsque l'axe de rotation est orienté dans le sens C_α vers C_β, C_β vers C_γ, etc., l'origine des rotations est telle que l'on a $\chi_J = 0$ pour la conformation plane éclipsée comme l'indique la figure 4 dans le cas où J = 1.

CALCULS CONFORMATIONNELS DES DIPEPTIDES : ANALYSE DES METHODES

Le calcul a priori d'une propriété faisant intervenir la disposition relative des atomes d'une molécule les uns par rapport aux autres (c'est-à-dire la conformation) nécessite avant tout une bonne connaissance des paramètres géométriques de base (angles et longueurs de liaison, angles de torsion, etc.).

Les nombreux travaux consacrés à leurs détermination ont conduit dans le cas des peptides à proposer des paramètres "standard" (15, 16) dont la plupart sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I - Paramètres géométriques "standard" d'une chaîne polypeptidique.

Liaison	Longueur en Å	Angles de liaisons	Valeur
$C_\alpha - C'$	1,53	$\tau(NC'C_\alpha)$	114°
$N - C_\alpha$	1,47	$\tau(NC'O)$	125°
$C' - N$	1,32	$\tau(OC'C_\alpha)$	121°
$C' = O$	1,24	$\tau(C_\alpha NC')$	123°
$N - H$	1,00	$\tau(C_\alpha NH)$	114°
$C_\alpha - H$	1,00	$\tau(HNC')$	123°
$C_\alpha - C_\beta$	1,53	$\tau(C'C_\alpha N)$	109,5°
$C_\beta - H$	1,00	$\tau(C'C_\alpha H)$	109,5°
$C_\beta - C_\gamma$	1,53	$\tau(C'C_\alpha C_\beta)$	109,5°

On sait, en outre, que le groupe peptide C'ONH possède une structure résonante plane par suite de la conjugaison du doublet libre de l'azote avec les électrons π du groupe carbonyle. La liaison C'-N acquiert ainsi un caractère partiel de double liaison tandis que la liaison C'=O s'affaiblit.

Enfin, il est bien établi que la conformation "trans" est énergétiquement favorisée par rapport à la forme "cis". C'est d'ailleurs ce qui est expérimentalement observé par diffraction des rayons X, sauf dans quelques cas particuliers (peptides cycliques, par exemple). Dans ces conditions, le groupe peptide est généralement considéré dans les travaux théoriques comme un motif rigide en conformation "trans" et, par conséquent, il suffit de déterminer les angles azimutaux Φ et ψ de la chaîne principale et éventuellement les angles χ_J de la chaîne latérale (R_1) pour définir la conformation d'un dipeptide.

La première étape commune aux méthodes d'analyse conformationnelle par le calcul consiste à obtenir les coordonnées des atomes de la molécule dans un même système d'axes en fonction des paramètres Φ, ψ et χ_J. Leur originalité intervient ensuite dans le choix de la forme des fonctions utilisées pour décrire les propriétés caractéristiques de chaque atome en fonction de leur nature et de leur position relative.

121 - APPROXIMATION DES SPHERES INCOMPRESSIBLES ("HARD SPHERES")

Dans ce cas, chaque atome est assimilé à une sphère incompressible de rayon égal au rayon de VAN DER WAALS (r_i) correspondant. Lorsque deux atomes A et B sont au contact, la distance qui sépare leur centre (d_{AB}) est égale à la somme $r_A + r_B$. On peut ainsi établir une liste des distances théoriques de contact telle que celle proposée par LEACH et coll.(17). Le calcul consiste alors, pour une conformation donnée, à comparer la distance qui sépare chaque couple d'atomes à la distance théorique de contact correspondante. Si la première est inférieure à la seconde pour une seule paire d'atomes, il y a recouvrement et la conformation est dite "stériquement interdite". Dans le cas où n'intervient aucun recouvrement, la conformation est dite "stériquement permise". Ce test, appliqué à toutes les conformations obtenues en faisant varier Φ, ψ et éventuellement les χ_J suivant de petits incréments (de 10° en 10° par exemple), permet de délimiter sur les cartes conformationnelles des zones stériquement permises et des zones interdites. Une telle méthode a été appliquée pour la première fois aux peptides par RAMACHANDRAN et coll.(99) et a été ensuite étendue systématiquement aux séquences dipeptidiques par LEACH et coll.(17).

Il est évident que ce procédé qui consiste, en fait, à manipuler mathématiquement un modèle moléculaire, ne permet pas de faire un choix parmi les conformations retenues, donc ne peut conduire à la détermination de la conformation la plus stable.

122 - METHODE DES POTENTIELS D'INTERACTION

Cette méthode qui présente différentes variantes suivant les auteurs a été largement utilisée par LIQUORI et coll.(18), SCHERAGA et coll.(19, 20), FLORY et coll.(21), POPOV et coll.(22), ainsi que par RAMACHANDRAN et coll.(23). Elle est essentiellement fondée sur l'hypothèse de l'existence dans une molécule de forces agissant sur les atomes non liés, leur nature étant fonction de la distance interatomique. Ainsi, à courte distance, ces forces sont répulsives et proviennent du recouvrement des nuages électroniques ; elles sont par contre attractives à longue distance. On considère habituellement que ces derniers correspondent à une interaction de type VAN DER WAALS entre atomes neutres à laquelle s'ajoutent les interactions électrostatiques entre charges partielles provenant de la formation des liaisons covalentes. Dans ces conditions, l'énergie totale (V) de la molécule isolée peut être exprimée comme une somme de contributions interatomiques attractives et répulsives. On est alors conduit à une équation de la forme :

$$V = V_{NL} + V_{RI} + V_{ES} + V_{LH} + V_L + V_\tau$$

dans laquelle $V_{NL} = V_a + V_r$ avec

V_a : terme attractif de VAN DER WAALS (appelé aussi terme de LONDON)

V_r = terme répulsif

V_{RI} : Energie associée à la déformation des angles dièdres (rotation interne).

V_{ES} : Energie électrostatique

V_{LH} : Energie de formation d'une liaison hydrogène

V_L : Energie liée à la variation des longueurs de liaison

V_τ : Energie associée à la déformation des angles de liaison.

Il faut remarquer que la plupart des auteurs admettent $V_L = V_\tau = 0$, ce qui signifie que les longueurs et les angles de liaison sont des invariants conformationnels.

Il convient maintenant d'analyser plus en détail l'expression mathématique des différents termes et de faire apparaître à cette occasion les éléments qui diffèrencient les nombreuses variantes de cette méthode semi-empirique de calcul par sommation de potentiels.

A) Terme attractif de VAN DER WAALS

Une théorie quantique des forces attractives conduisant à une expression de l'énergie d'interaction en fonction de la distance interatomique a été proposée depuis longtemps par LONDON (24). Ces forces sont appelées "attraction de VAN DER WAALS" ou "forces de dispersion de LONDON". L'image de cette théorie en mécanique classique est la suivante : les noyaux et les électrons des atomes sont animés de mouvements oscillatoires continus les uns par rapport aux autres. Ces déplacements conduisent à une séparation des centres de charges positifs et négatifs, donc à la formation de dipôles instantanés. L'énergie d'interaction de ces dipôles est donnée par une expression de la forme :

$$V_a = - A/r^6$$

dans laquelle A est relié aux propriétés atomiques, en particulier aux polarisabilités des deux atomes qui interagissent. Son expression est tirée de l'équation de SLATER et KIRKWOOD :

$$A = \frac{3/2\ e\ (\hbar/\sqrt{m})\ \alpha_1\ \alpha_2}{\sqrt{\alpha_1/N_1} + \sqrt{\alpha_2/N_2}}$$

α_1 et α_2 étant les polarisabilités des atomes en interaction, N_1 et N_2 les nombres effectifs d'électrons polarisables de ces atomes, e, m, $\hbar = (\frac{h}{2\pi})$ les constantes fondamentales habituelles. Les valeurs de N sont tirées des travaux de PITZER (25) complétés par ceux de SCOTT et SCHERAGA (26), tandis que les polarisabilités sont obtenues à partir des travaux de KETELAAR (27).

B) Terme répulsif et analyse de la forme du potentiel V_{NL}

Le choix d'un terme convenable représentant la variation de la force de répulsion entre deux atomes neutres en fonction de la distance qui les sépare conduit à des fonctions V_{NL} de types variés (16). Cependant, deux d'entre elles sont le plus souvent utilisées :

$$V_{NL} = - \frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}} \quad \text{(fonction de LENNARD-JONES)} \quad (I)$$

$$V_{NL} = - \frac{A}{r^6} + Be^{-\mu r} \quad \text{(fonction de BUCKINGHAM)} \quad (II)$$

Leurs graphes sont représentés sur la figure 5.

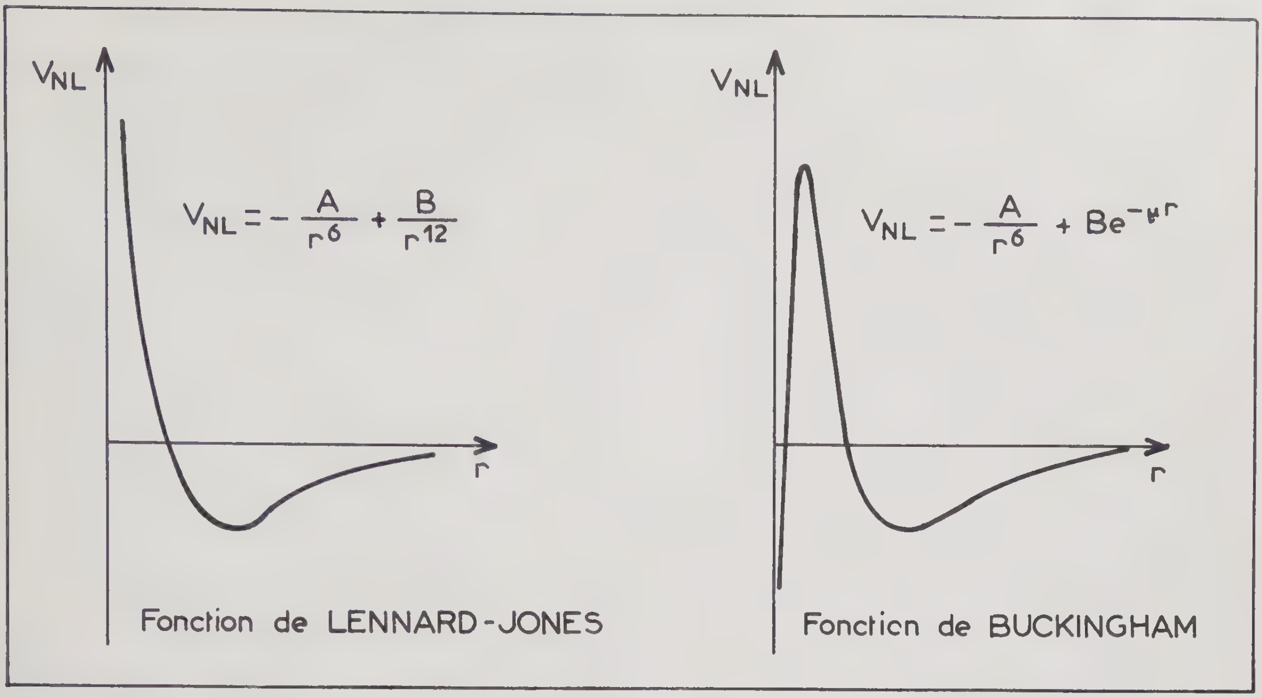


Fig. 5 : Variation du potentiel d'interaction entre atomes non liés en fonction de leur distance.

Ces deux fonctions sont pratiquement confondues aux distances moyennes, mais diffèrent au voisinage de r = 0. La relation (II) présente deux inconvénients majeurs quant à son traitement sur ordinateur : on sait en effet que le temps de calcul d'un terme exponentiel est supérieur à celui d'un terme puissance : de plus, bien que conduisant comme le potentiel de LENNARD-JONES, à des valeurs positives de l'énergie à courte distance, elle redonne des valeurs négatives pour des distances interatomiques très faibles physiquement exclues. Il est évidemment possible de remédier à cette difficulté lors de l'élaboration du programme mais au prix d'une augmentation certaine du temps de calcul.

Dans les deux cas, le terme B est ajusté pour que V_{NL} prenne une valeur minimale lorsque r = R, R étant égal à la somme des rayons de VAN DER WAALS des atomes en interaction. Le paramètre μ de la fonction de BUCKINGHAM est évalué à partir des données sur les collisions dans les gaz rares. Par conséquent, les atomes qui possèdent les mêmes couches électroniques complètes que le gaz rare correspondant prennent la même valeur de μ. Il faut signaler enfin que la fonction de BUCKINGHAM comporte trois paramètres tandis que le potentiel de LENNARD-JONES n'en contient que deux.

C) Potentiel de torsion (V_{RI})

D'après SCOTT et SCHERAGA (26), l'empêchement à la rotation autour d'une simple liaison provient d'une part des forces de VAN DER WAALS entre atomes non liés appartenant aux liaisons adjacentes à l'axe de rotation considéré et d'autre part des interactions d'échange entre les électrons de ces mêmes liaisons. Les forces de VAN DER WAALS sont décrites par des potentiels de type BUCKINGHAM ou LENNARD-JONES comme nous venons de le voir, tandis que les interactions d'échange sont représentées par une fonction périodique. La plupart des auteurs s'accordent sur cette hypothèse, mais les divergences apparaissent lors de l'évaluation de la valeur numérique du paramètre de la fonction périodique. Comme aucune information ne peut être obtenue directement sur les peptides, il est nécessaire d'estimer cette quantité par analogie avec des molécules modèles pour lesquelles on dispose de données expérimentales.

a) Liaison C_α - C'

Les molécules de type $CH_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - X$ constituent les meilleurs modèles pour étudier cette liaison (X = H, F, Cl, Br, CN, OH, CH_3 ou C_2H_5). Dans de tels cas, la rotation interne autour de la liaison C-C est décrite par une fonction périodique à 3 minimums et 3 maximums d'égale énergie, les 3 minimums intervenant lorsque la liaison C-X est alternée par rapport aux liaisons CH du groupe méthyle (figure 6).

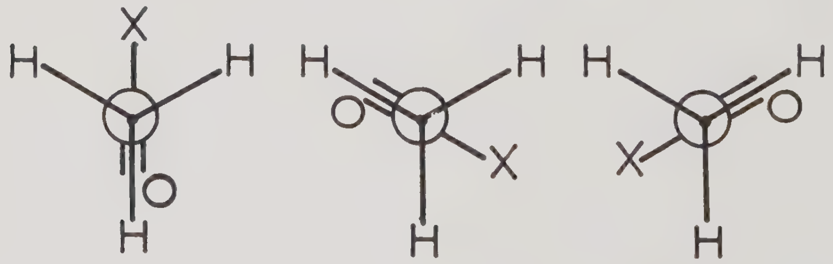


Fig. 6 : Projection de Newman des trois minima d'égale énergie dans le cas des molécules $CH_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - X$

Il est donc raisonnable de penser que, dans une chaîne polypeptidique, les minima seront localisés au voisinage des angles ψ = 180° et ± 60° et les maxima pour ψ = 0 et ± 120°.

Les hauteurs des barrières relatives aux différents composés modèles sont résumées dans le tableau II. L'examen de ces différents résultats suggère que la hauteur de la barrière est comprise entre 0,48 et 1,30 Kcal.mole^{-1}. Cependant, en accord avec l'interprétation de SCHELLMAN et SCHELLMAN (29) il semble

TABLEAU II : Barrières à la rotation interne pour des molécules de type $CH_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - X$ (28).

Composés	Barrière (Kcal.mole^{-1})
CH_3CHO	1,17
CH_3CFO	1,04
CH_3CClO	1,30
CH_3CBrO	1,30
$CH_3C(CN)O$	1,27
CH_3COOH	0,48
CH_3COCH_3	0,76
$CH_3COC_2H_5$	0,50

que l'acide acétique soit le modèle le plus satisfaisant pour évaluer le paramètre de la fonction périodique. Pour cela, après avoir estimé la contribution du terme provenant des forces de VAN DER WAALS entre atomes non liés et l'avoir ôté de la valeur numérique expérimentale de la barrière (0,48 Kcal.mole^{-1}) SCOTT et SCHERAGA (19) proposent un potentiel intrinsèque de torsion de la forme

$$V_\psi = \frac{1}{2} V^\circ_\psi \ (1 - \cos 3\psi)$$

avec $V^\circ\psi$ = 0,2 Kcal.mole^{-1}. BRANT et FLORY (30) adoptent la valeur $V^\circ\psi$ = 1,0 Kcal.mole^{-1} tandis que LIQUORI et coll.(18) négligent cette contribution dans leur calcul.

b) Liaison N-C_α

Il est plus difficile de trouver des petites molécules modèles qui fournissent des renseignements transposables à la liaison N-C_α des peptides. Toutefois, si l'on considère la liaison C'-N comme une double liaison, la situation est semblable à celle des molécules du tableau II dans lesquelles la liaison C'-N joue le rôle de C=O et N-H celui de C-X ; l'expression du potentiel intrinsèque de torsion autour de cette liaison sera donc :

$$V_\phi = \frac{1}{2} V_\phi^\circ \quad (1 + \cos 3\,\Phi)$$

La valeur numérique de V_ϕ° est, elle aussi, variable, suivant les auteurs puisqu'elle dépend, comme dans le cas de V_ϕ, de la manière dont on évalue avant de le soustraire le terme correspondant aux forces de VAN DER WAALS entre atomes non liés. V_ϕ° est égal à 0,6 Kcal.mole^{-1} dans les calculs de SCOTT et SCHERAGA (19) et 1,5 Kcal.mole^{-1} dans ceux de BRANT et FLORY (30), tandis que LIQUORI et coll.(18) négligent encore cette contribution.

Enfin, bien que les connaissances actuelles concernant la nature et la hauteur des barrières à la rotation autour des liaisons N-C_α et C_α-C' demeurent très insuffisantes, il semble d'ores et déjà admis que ces hauteurs soient très inférieures à celles qui correspondent aux simples liaisons C-C des hydrocarbures et des polymères vinyliques (3 Kcal.mole^{-1} environ).

D) Interaction électrostatique (V_{ES})

BRANT et FLORY (30) ont, les premiers, mis en évidence l'importance des interactions dipôle-dipôle entre groupements amide dans les calculs d'énergie conformationnelle. Pour en simplifier la formulation, la plupart des auteurs affectent aux atomes C', O, N et H une charge partielle ajustée pour rendre compte de l'intensité, de la direction et du sens du vecteur moment dipolaire associé au groupe amide. Dans ces conditions, le potentiel d'interaction électrostatique peut être calculé selon une loi coulombienne :

$$V_{ES} = \sum_{\substack{\text{toutes les}\\\text{charges}}} - \frac{e_i \,.\, e_j}{\varepsilon \,.\, r_{ij}}$$

e_i et e_j étant les charges relatives aux atomes i et j, r_{ij} la distance interatomique et ε la constante diélectrique effective du milieu. La valeur prise pour cette dernière varie sensiblement suivant les travaux. BRANT et FLORY utilisent

$\varepsilon = 3{,}5$ (30), SCOTT et SCHERAGA prennent $\varepsilon = 4$ (19), tandis que RAMACHANDRAN et coll.(23) pensent que la valeur $\varepsilon = 1$ correspondant à la constante diélectrique du vide est plus appropriée puisqu'il s'agit d'interactions entre atomes distants seulement de quelques angströms, abstraction faite du milieu.

E) Liaisons hydrogène (V_{LH})

Le terme V_{LH} destiné à rendre compte des liaisons hydrogène de type N-H...O dans les peptides apparaît pour la première fois dans les travaux de DE SANTIS et coll.(18). Pour cela, ces auteurs ont utilisé la relation proposée par STOCKMAYER (31) pour décrire les interactions entre molécules polaires.

LIPPINCOTT et SCHRODER (32) ont élaboré ultérieurement une théorie complète plus satisfaisante qui conduit à un potentiel V_{LH} de la forme :

$$V_{LH} = D\left\{1 - \exp\left[\frac{-n(r - r_o)^2}{2r}\right]\right\} - D^{\star}\exp\left[\frac{-n^{\star}(R - r - r_o^{\star})^2}{2(R - r)}\right] + Ae^{-bR} - \frac{1}{2}A\left(\frac{R_o}{R}\right)^m \exp(-bR_o)$$

Dans cette expression, le premier terme représente l'énergie d'élongation de la liaison N-H de sa longueur normale r_o à sa longueur r lorsqu'une liaison hydrogène est formée. Le second terme est semblable au précédent, mais concerne la liaison H...O. Les troisième et quatrième termes représentent respectivement une répulsion de VAN DER WAALS et une attraction électrostatique entre les atomes O et N. D, $D^{\star}$, n et $n^{\star}$ sont des paramètres ajustables (32), R est la distance N-O et R_o représente cette même distance au minimum de la fonction potentiel ; m, qui peut varier de 1 à 6, détermine la loi de puissance pour le terme électrostatique.

MOULTON et KROMHOUT (33) ont modifié cette fonction en introduisant des termes qui dépendent des angles θ_1 ($\widehat{HNO}$) et θ_2 ($\widehat{HON}$) pour tenir compte du caractère angulaire de la liaison hydrogène. Cette modification qui affecte les deux premiers termes de V_{LH} n'apparaît en fait que sur le second car l'expression :

$$D\left\{1 - \exp\left[\frac{-n(r - r_o)^2}{2r}\right]\right\}$$

est nulle dans la mesure où la longueur de la liaison N-H est fixée.

Dans ces conditions, le terme V_{LH} devient :

$$V_{LH} = -D^{\star}\cos^2\theta_1\cos^2\theta_2\exp\left[\frac{-n^{\star}(R - r - r_o^{\star})^2}{2(R - r)}\right] + Ae^{-bR} - \left(\frac{1}{2}\right)A\left(\frac{R_o}{R}\right)^m \exp(-bR_o)$$

Ce potentiel a été utilisé tel quel par SCOTT et SCHERAGA (19) et par OOI et coll.(20). Il faut remarquer que si l'on introduit dans l'expression de l'énergie totale une relation de ce type tenant explicitement compte des interactions non liées et électrostatiques entre les atomes N, H et O, leurs contributions ne doivent pas être introduites une seconde fois lors du calcul des termes V_{NL} et V_{ES}.

123 - METHODES QUANTIQUES GLOBALES

Plus récemment, grâce à l'emploi de gros ordinateurs, le problème du calcul de l'énergie d'un dipeptide en fonction de sa conformation a pu être abordé par des méthodes quantiques globales traitant explicitement tous les électrons de valence ($\sigma + \pi$).

La comparaison de ces différentes méthodes et la justification des approximations intervenant dans chacune d'entre elles dépasse le cadre de notre analyse. Nous nous limiterons donc ici à une présentation très générale.

Le procédé E.H.T. (Extended Hückel Theory) mis au point par HOFFMANN (34) fournit une solution approchée aux équations L.C.A.O. de HARTREE-FOCK pour tous les électrons de valence du système. Dans cette approximation, les répulsions électroniques ne sont pas introduites explicitement. Les éléments matriciels sont évalués à partir du calcul des orbitales de recouvrement. La méthode a été appliquée à quelques systèmes peptidiques par HOFFMANN et IMAMURA (35), SCHERAGA et coll.(36) ainsi que par ROSSI et coll.(37).

La théorie CNDO/2 (Complete Neglect of Differential Overlap) de POPLE et SEGAL (38) traite également tous les électrons de valence mais inclut explicitement les interactions électroniques. Ce procédé à "champ auto-cohérent" utilise l'approximation Z.D.O. (Zero Differential Overlap). SCHERAGA et coll.(36) l'ont appliqué conjointement à la méthode E.H.T. pour approfondir les bases théoriques des différents termes qui interviennent dans la méthode semi-empirique des potentiels d'interaction.

La méthode P.C.I.L.O. (Perturbative Configuration Interaction using totaly Localised Orbitals) proposée par DINER et coll.(39) permet de traiter la molécule comme un ensemble d'espèces bicentriques et biélectroniques représentant les liaisons chimiques ; dans ce formalisme, il est possible de construire un ensemble d'orbitales liantes et antiliantes localisées sur ces liaisons. Les orbitales liantes sont utilisées pour obtenir un déterminant de SLATER totalement localisé représentant l'approximation d'ordre zéro pour l'état fondamental de la molécule, et les orbitales antiliantes permettent de construire des déterminants de SLATER relatifs aux configurations excitées. Dans la base des déterminants ainsi

obtenus, l'Hamiltonien moléculaire est représenté par une matrice d'interaction de configurations. La plus basse valeur propre et le vecteur propre qui lui est associé, c'est-à-dire l'énergie et la fonction d'onde correspondant à l'état fondamental, sont obtenus par un développement de perturbation RAYLEIGH-SCHRÖDINGER calculé jusqu'au troisième ordre.

Dans la pratique, la méthode P.C.I.L.O. utilise les mêmes hypothèses de travail et une paramétrisation semblable à celle de la théorie C.N.D.O./2 mais sa structure additive permet un temps de calcul relativement court par rapport aux autres méthodes quantiques qui comportent toutes des processus itératifs. Ce procédé a été systématiquement mis en oeuvre dans le cas des dipeptides par PULLMAN et coll.(40 à 45).

- Chapitre 3 -

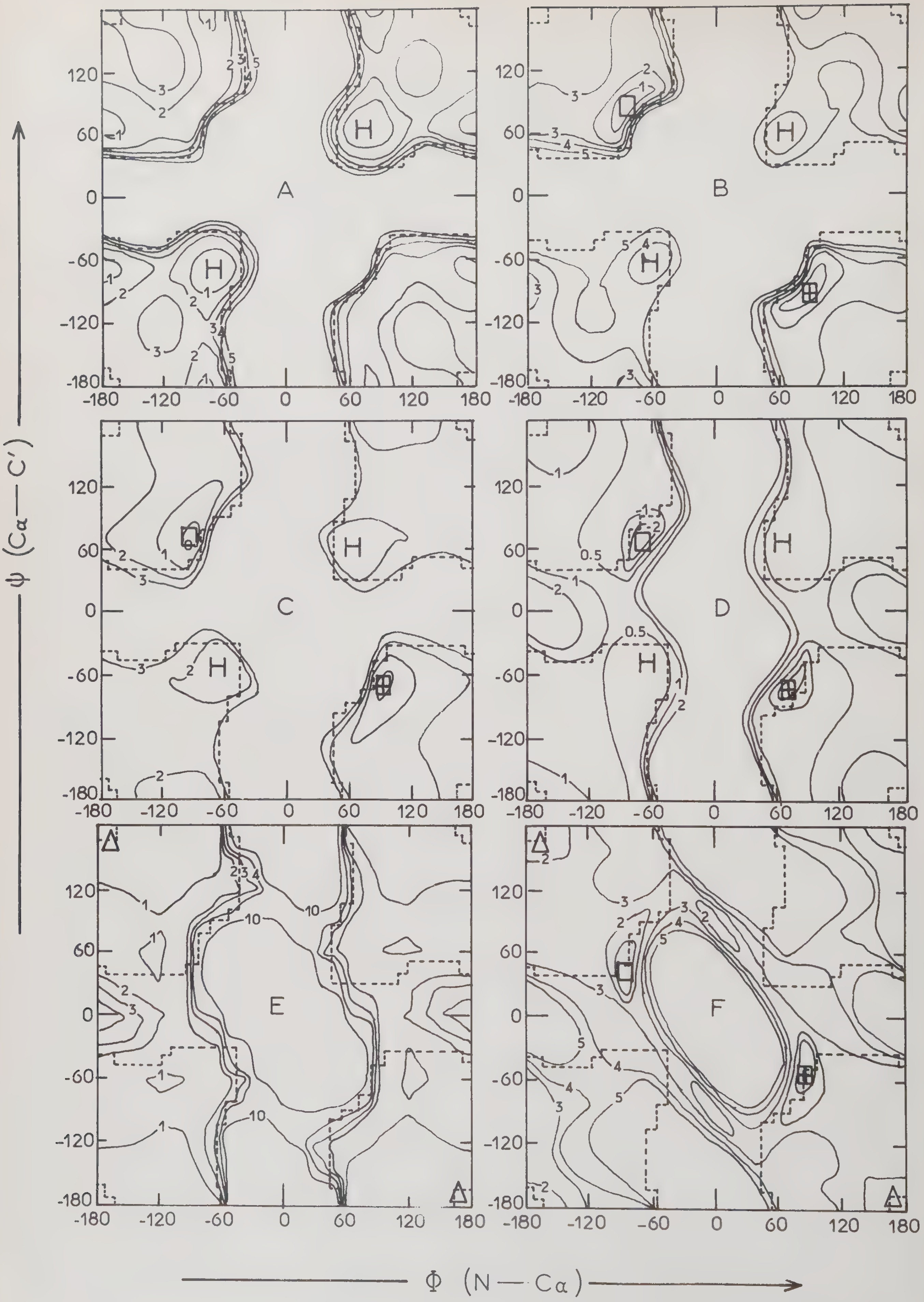
PRESENTATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

Dans ce chapitre, nous présentons et discutons les résultats des calculs conformationnels théoriques correspondant aux dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-CH_3 (ou aux séquences dipeptidiques C_α-CONH-CHR_1-CONH-C_α qui sont pratiquement assimilables aux dipeptides). Nous n'aborderons pas ici l'analyse des cartes conformationnelles calculées dans le cas des structures hélicoïdales d'homopolypeptides, car, bien que susceptibles de fournir de précieux renseignements complémentaires, elles ne peuvent être utilisées directement pour interpréter nos résultats expérimentaux.

A titre d'exemple, nous avons regroupé sur les figures 7, 8, 9, 10 les principaux diagrammes conformationnels de quelques dipeptides ou séquences dipeptidiques à chaînes latérales hydrocarbonées aliphatiques ou aromatiques correspondant respectivement aux résidus Glycyl (R_1 = H), Alanyl (R_1 = CH_3) Valyl (R_1 = $CH(CH_3)_2$ et Phénylalanyl (R_1 = CH_2 -⟨φ⟩).

L'examen de ces différentes cartes fait apparaître en premier lieu un élargissement notable des zones de conformations possibles à mesure que la méthode de calcul devient plus raffinée. Ce phénomène, particulièrement marqué dans le cas des résidus volumineux (Val et Phe), s'accompagne en outre d'une augmentation du nombre de minima locaux. La comparaison des diagrammes obtenus par l'application des différentes variantes de la méthode des potentiels d'interaction montre une grande disparité des résultats énergétiques en fonction du type de calcul mis en oeuvre. Il semble que ce désaccord soit attribuable pour une large part à la manière dont il est tenu compte des possibilités de formation de liaisons hydrogène intramoléculaires (chélations) entre unités peptidiques contigües. Notons, enfin, que la comparaison directe des résultats obtenus par calculs semi-empiriques et quantiques s'avère très délicate car ces deux méthodes ne font apparaître explicitement aucun paramètre commun.

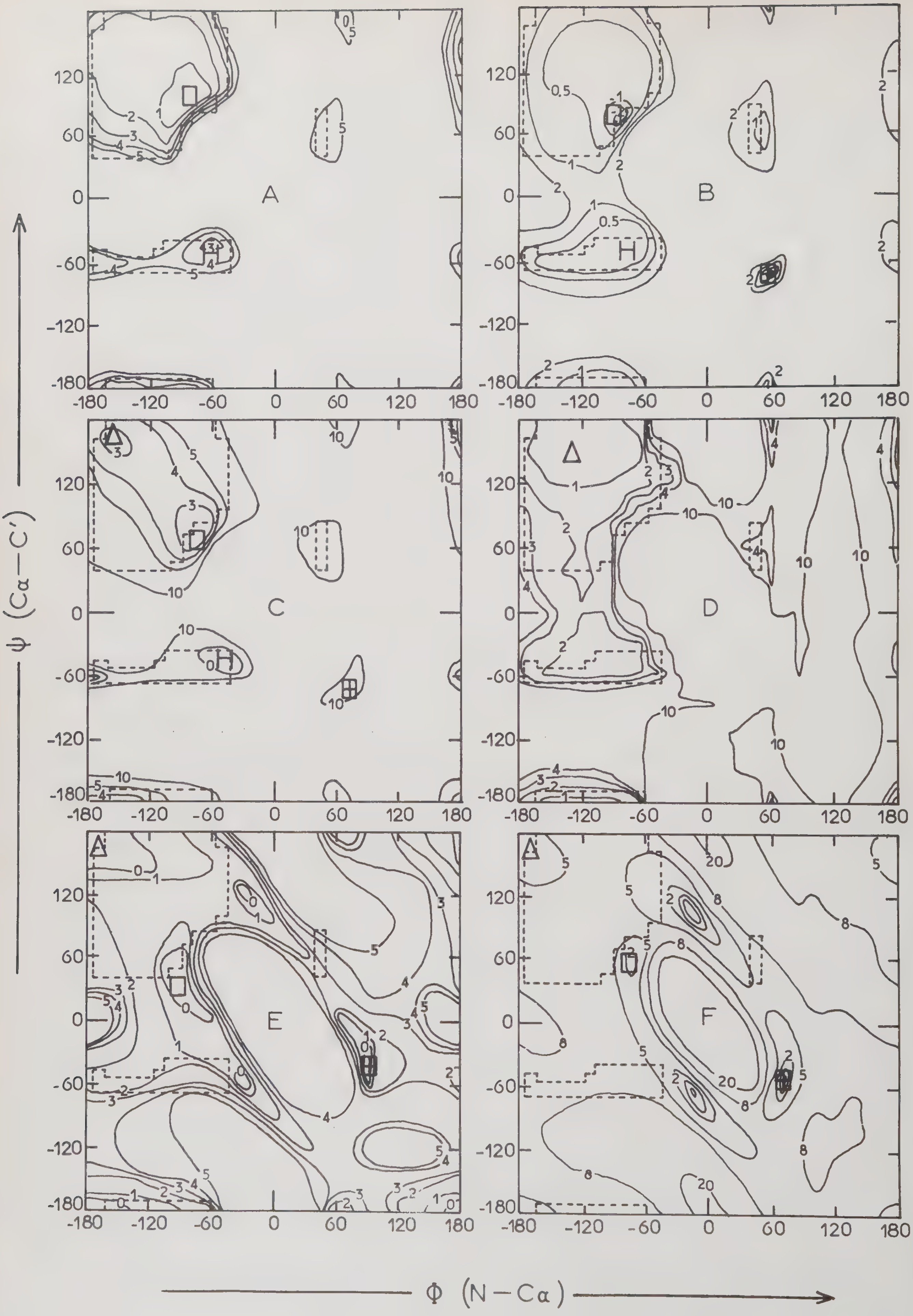
Il convient d'examiner maintenant le détail des différentes cartes conformationnelles suivant la nature de la chaîne latérale (R_1).



A
B
C
D
E
F
H
ψ (Cα — C′)
Φ (N — Cα)
-180
-120
-60
0
60
120
180

<u>Fig. 7</u> : CARTES CONFORMATIONNELLES DU DIPEPTIDE A Gly MA (R_1 = H ; R_2 = CH_3)

- A, B, C, D : méthodes des potentiels d'interaction
- E, F : méthodes quantiques
- A chaque point (Φ, ψ) de l'espace conformationnel est associée la valeur de l'énergie de la conformation correspondante exprimée en Kcal.mole^{-1}.
  Les points figuratifs de même énergie sont reliés par des lignes de niveau (courbes d'isoénergie).
- Dans les diagrammes A, B, C, E, F, la conformation d'énergie minimale est prise comme origine. Dans le diagramme D, l'origine des énergies est fixée au point $\phi = -60°$, $\psi = -60°$.
- A : d'après D.A. BRANT et coll.(21) (Interactions dipolaires exclues)
- B : d'amrès D.A. BRANT et coll.(21) (Interactions dipolaires comprises)
- C : d'après R.A. SCOTT et H.A. SCHERAGA (19)
- D : d'après E.M. POPOV et coll.(22)
- E : d'après R. HOFFMAN et A. IMAMURA (35) (E.H.T)
- F : d'après MAIGRET et coll.(40) (P.C.I.L.O.)
- Les contours représentés en traits pointillés délimitent les domaines stériquement permis (intérieur) et interdits (extérieur) d'après les calculs de S.J. LEACH et coll.(17) utilisant l'approximation "Hard Sphere".
- Δ : forme étendue (C_5)
- □ : forme repliée (C_7)
- H : forme hélice α



ψ (Cα−C′)
Φ (N−Cα)
A
B
C
D
E
F

<u>Fig. 8</u> : CARTES CONFORMATIONNELLES DU DIPEPTIDE A Ala MA ($R_1 = CH_3$; $R_2 = CH_3$)

- A, B, C : méthodes des potentiels d'interaction
- D, E, F : méthodes quantiques
- Dans les diagrammes A, C, D, E, F, la conformation d'énergie minimale est prise comme origine. Dans le diagramme B, l'origine des énergies est fixée au point $\phi = -60°$, $\psi = -60°$.
- A : d'après D.A. BRANT et coll.(21)(Interactions dipolaires comprises)
- B : d'après E.M. POPOV et coll.(22)
- C : d'après G.M. CRIPPEN et H.A. SCHERAGA (49)
- D : d'après R. HOFFMAN et A. IMAMURA (35) (E.H.T.)
- E : d'après B. MAIGRET et coll.(45) (P.C.I.L.O.)
- F : d'après F.A. MOMANY et coll. (36) (C.N.D.O.)
- Les contours représentésen traits pointillés délimitent les domaines stériquement permis (intérieur) et interdits (extérieur) d'après les calculs de S.J. LEACH et coll.(17) utilisant l'approximation "Hard Sphere".
- Δ : forme étendue (C_5)
- □ : forme repliée (C_7 équatorial)
- ⊞ : forme repliée (C_7 axial)
- H : forme hélice α

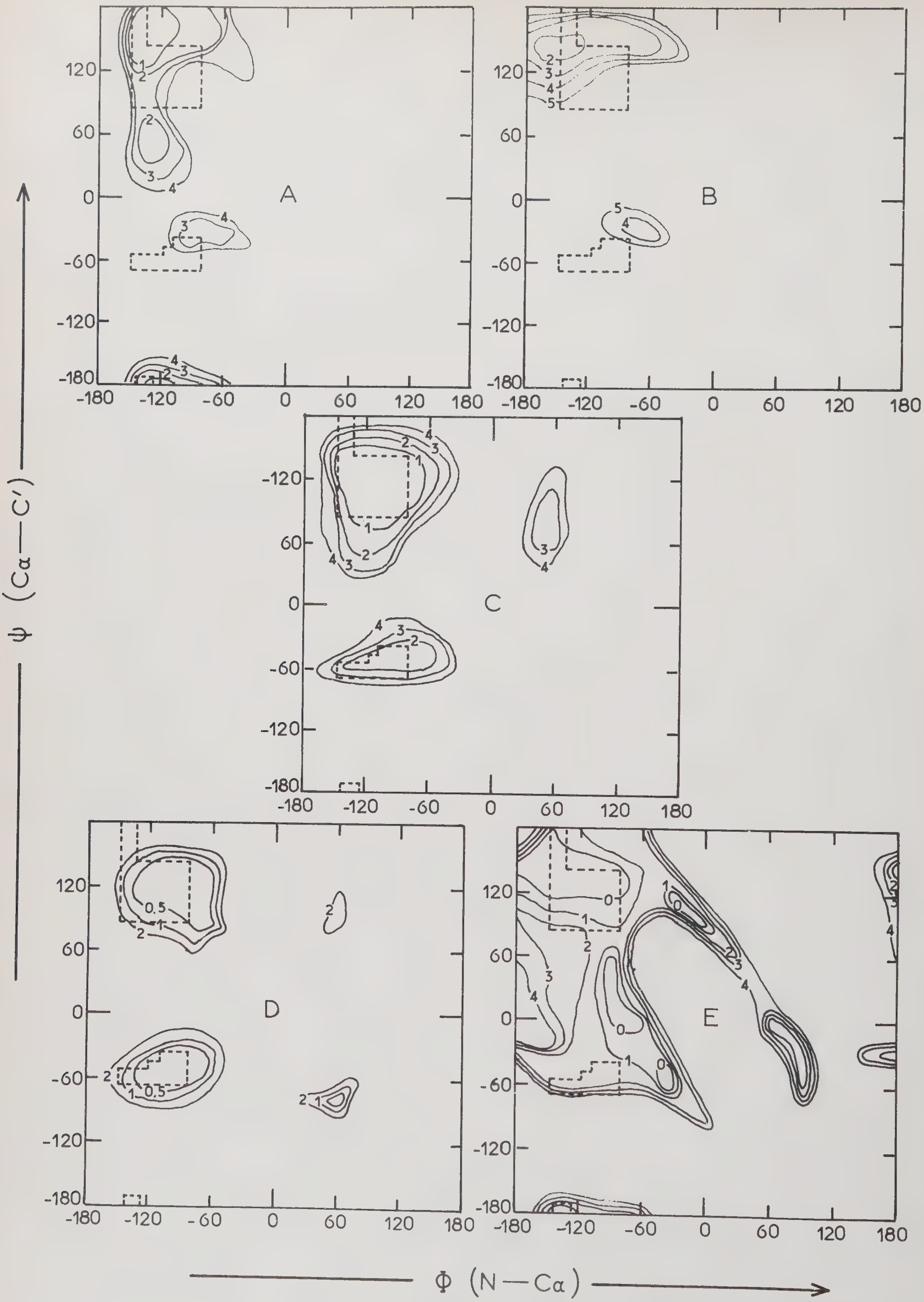

A
B
C
D
E
Ψ (Cα—C′)
Φ (N—Cα)
-180
-120
-60
0
60
120
180

Fig. 9 : CARTES CONFORMATIONNELLES DU DIPEPTIDE A Val MA (R_1 = $CH(CH_3)_2$, R_2 = CH_3).

- A, B, C, D : méthodes des potentiels d'interaction
- E : méthodes quantiques
- Dans les diagrammes A, B, C, E, la conformation d'énergie minimale est prise comme origine. Dans le diagramme D, l'origine des énergies est fixée au point $\phi = -80°$, $\psi = -60°$.
- A : d'après P.K. PONNUSWAMY et V. SASISEKHARAN (100) ($\chi_1 = 60°$).
- B : d'après P.K. PONNUSWAMY et V. SASISEKHARAN (100) ($\chi_1 = 180°$).
- C : d'après P.K. PONNUSWAMY et V. SASISEKHARAN (100) ($\chi_1 = 300°$).
- D : d'après E.M. POPOV et coll.(22).
- E : d'après B. MAIGRET et coll.(101) (P.C.I.L.O.).
- Les contours représentés en traits pointillés délimitent les domaines stériquement permis (intérieur) et interdits (extérieur) d'après les calculs de S.J. LEACH et coll.(17) utilisant l'approximation "Hard Sphere".

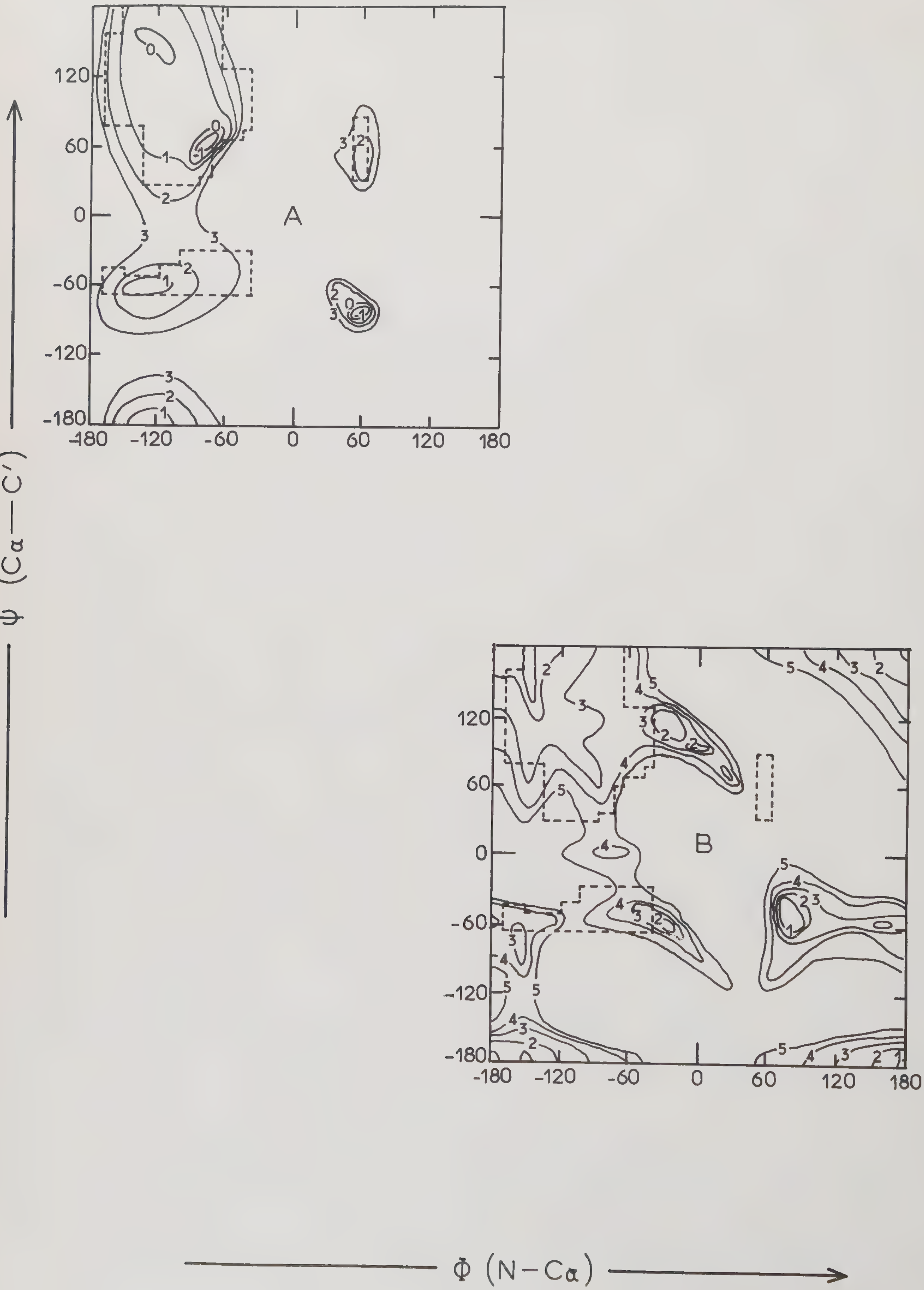

A
B
Ψ (Cα—C′)
Φ (N−Cα)
-180 -120 -60 0 60 120 180

Fig. 10 : CARTES CONFORMATIONNELLES DU DIPEPTIDE A Phe MA ($R_1 = CH_2$ - ⟨φ⟩ , $R_2 = CH_3$).

- Dans le diagramme B, la conformation d'énergie minimale est prise comme origine. Dans le diagramme A, l'origine des énergies est fixée arbitrairement au point $\phi = -120°$, $\psi = 150°$, $\chi_1 = 300°$, $\chi_2 = 90°$.
- A : d'après G.M. LIPKIND et coll.(102) (Méthode des potentiels d'interaction).
- B : d'après MAIGRET et coll.(41) (Méthode quantique P.C.I.L.O.).
- Les contours représentés en traits pointillés délimitent les domaines stériquement permis (intérieur) et interdits (extérieur) d'après les calculs de S.J. LEACH et coll.(17) utilisant l'approximation "Hard Sphere".

131 - DIPEPTIDE DE LA GLYCINE : A Gly MA (R_1 = H)

Dans ce cas particulier, le plan bissecteur du groupement $C_\alpha H_2$ central est un élément de symétrie de la molécule. Ceci se traduit sur les diagrammes conformationnels par l'existence d'un centre de symétrie au point $\Phi = 0°$, $\psi = 0°$. Les calculs quantiques (7_E, 7_F) font apparaître un minimum local dans la zone $\Phi = \pm 180°$, $\psi = \pm 180°$ (Δ) correspondant à la conformation totalement étendue alors que cette possibilité , écartée par toutes les méthodes semi-empiriques est totalement exclue par les calculs "Hard Sphere". Par ailleurs, si la plupart des auteurs, tenant compte du terme électrostatique V_{ES} s'accordent sur la présence d'une zone de basse énergie (□) localisée vers $\Phi = \pm 180°$, $\psi = \pm 60°$ (7_B 7_C 7_D 7_F) ce domaine n'apparait pas dans les résultats obtenus par la méthode quantique E.H.T (7_E) et se situe à la limite des conformations stériquement permises par le procédé "Hard Sphere". Enfin, le domaine relatif à la disposition α - hélicoïdale $\Phi = \pm 60°$, $\psi = \pm 50°$ (H) situé dans une zone stériquement permises par Hard-Sphere correspond à un minimum local dans quelques cas (7_A 7_B 7_C 7_D) mais n'est pas reconnue comme tel par les calculs quantiques (7_E, 7_F).

132 - DIPEPTIDE DE L'ALANINE : A Ala MA ($R_1 = CH_3$)

Les données concernant ce composé sont particulièrement significatives, car il est admis que le résidu Alanyl représente l'ensemble des résidus contenant un C_β (45). On constate dans ce cas, comme dans celui du résidu Glycyl une assez grande divergence dans les résultats obtenus. Ainsi, le minimum local vers $\Phi \simeq -180°$ et $\psi \simeq +180°$ (Δ) mis en évidence pour la première fois par une méthode semi-empirique (8_C) et obtenus par la plupart des calculs quantiques (8_D 8_E et 8_F) n'apparait pas dans les diagrammes 8_A et 8_B. De plus, il appartient parfois à une zone stériquement exclue par "Hard Sphere". Les deux domaines de faible énergie correspondant aux deux conformations "chélatées" suivant un cycle à sept chaînons situés vers $\Phi \simeq -80°$, $\psi \simeq 40°$ (□) et $\Phi \simeq 80°$, $\psi \simeq -40°$ (⊞) apparaissent dans la plupart des diagrammes sauf dans 8_A pour lequel, seule la première éventualité est retenue et dans 8_D, qui exclut les deux formes. En dépit de cet accord apparent, l'ordre de stabilité des deux isomères varie suivant la méthode de calcul utilisée. Signalons, par ailleurs, que la première conformation est située à la limite de la zone stériquement permise par "Hard Sphere" alors que la seconde est exclue par ce type de calcul. D'autres minima localisés au voisinage des structures α -hélicoïdales droites et gauches dans les cartes 8_A, 8_B, 8_C (H) sont déplacés ou disparaissent totalement des diagrammes calculés par les méthodes quantiques. Il faut enfin

remarquer que tous les domaines de basse énergie mis en évidence en utilisant les méthodes P.C.I.L.O. et C.N.D.O./2 se situent hors des zones stériquement permises par "Hard Sphere" (8_E 8_F).

Une étude comparative semblable pourrait être faite dans le cas des dipeptides de la valine et de la phénylalanine (figures 9 et 10). Il ne nous a pas semblé utile à ce stade d'en exposer les détails. Par contre, au terme de cette présentation des méthodes et des résultats de l'analyse conformationnelle théorique des systèmes dipeptidiques, il apparait essentiel de disposer dans un but comparatif, de données expérimentales précises, concernant les dipeptides à l'état isolé. C'est cette recherche qui constitue l'objet de notre deuxième partie.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA CONFORMATION DES DIPEPTIDES CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 EN MILIEU INERTE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

INTRODUCTION

La conformation d'une molécule à l'état dissous dépend à la fois des actions intramoléculaires entre atomes non liés et des actions intermoléculaires. Il est possible de minimiser ces dernières en isolant la molécule dans un milieu quasi-inerte. C'est ce que nous avons recherché dans le cas des dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 afin d'analyser l'influence sur la conformation des interactions à courte distance entre groupes peptides contigus. Cependant, la nécessité d'obtenir la molécule isolée soulève quelques difficultés pour ce type de composés car ils sont solides à la température ordinaire et très fortement autoassociés par liaison hydrogène NH...O=C. Par ailleurs, les dipeptides sont relativement peu solubles dans les solvants inertes usuels par suite du caractère acido-basique et polaire des groupements CONH. Dans ces conditions, le choix d'une technique convenant à l'étude de solutions très diluées apparait comme indissociable de celui du milieu. Par conséquent, nous avons dû nous limiter à l'analyse conformationnelle des dipeptides en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone et isolés en matrice d'argon au moyen de la spectroscopie infrarouge. En effet, parmi les techniques physicochimiques auxquelles on fait habituellement appel pour aborder un problème de structure moléculaire, seule la spectroscopie infrarouge présente une sensibilité suffisante pour étudier des solutions extrêmement diluées à condition toutefois que le solvant absorbe peu dans le domaine spectral choisi. C'est le cas du tétrachlorure de carbone dans la région des vibrations de valence ν(N-H) et ν(N-D) et de l'argon qui est, pour sa part, totalement transparent.

Certes, la spectroscopie infrarouge ne constitue en fait qu'une technique indirecte d'analyse des conformations puisqu'elle n'est pas adaptée à la mesure des paramètres géométriques. Cependant, l'interprétation d'un spectre infrarouge permet d'établir, au moins de manière qualitative, si la solution contient

un ou plusieurs isomères de rotation. En outre, il est bien connu que les phénomènes d'autoassociation et de chélation par liaison hydrogène provoquent des perturbations spectrales importantes qui sont facilement identifiables. Il est également possible de mettre en évidence des corrélations empiriques entre la fréquence d'un oscillateur et son environnement et de les interpréter en terme de structure. Enfin, l'analyse des couplages vibrationnels fournit généralement de précieuses indications sur la conformation moléculaire.

Au cours de cette deuxième partie, nous exposerons successivement les résultats que nous avons obtenus lorsque les dipeptides sont dissous dans le tétrachlorure de carbone (chapitre 1) ou isolés en matrice dans l'argon (chapitre 2). Enfin, nous présenterons une méthode de dosage des isomères de rotation des dipeptides en solution (chapitre 3).

- Chapitre 1 -

CONFORMATION DES DIPEPTIDES EN SOLUTION DILUEE DANS LE TETRACHLORURE DE CARBONE*

Dans un premier stade de recherche, nous avons plus spécialement étudié la conformation (ϕ, ψ) du squelette peptidique en cherchant à minimiser l'influence de la chaîne latérale. Cela implique que le substituant R_1 ne contienne pas de groupe fonctionnel susceptible d'interagir fortement avec les motifs CONH. Les chaînes latérales hydrocarbonées (aliphatiques ou aromatiques) satisfont à ce critère. Elles permettent en outre d'évaluer comparativement l'influence conformationnelle de l'effet stérique de R_1 et celle des autres interactions à courte distance. C'est pourquoi nous avons considéré dans ce chapitre une série de dipeptides possédant des chaînes latérales hydrocarbonées d'encombrement variable. La liste de ces composés figure dans le tableau III-a.

D'un point de vue expérimental, les dipeptides ont été synthétisés et purifiés selon la méthode décrite par NEEL et coll.(46). Les longueurs de cuves varient de 10 à 30 cm ; en outre, un dispositif optique additionnel a dû être utilisé dans certains cas pour doubler le trajet optique à travers la cuve d'absorption. Les concentrations des solutions se situent entre 5.10^{-4} et 10^{-5} mole/litre. Dans ces conditions, les dipeptides présentent dans la région des vibrations de valence ν(N-H) (entre 3500 et 3300 cm^{-1}) un massif complexe dont le profil varie fortement en fonction de la concentration. On observe en particulier une large bande vers 3300 cm^{-1} qui disparait par dilution : elle est attribuable sans aucune difficulté aux vibrateurs NH participant aux liaisons hydrogène intermoléculaires qui stabilisent les formes autoassociées. Une étude systématique de l'intensité relative des bandes d'absorption en fonction de la dilution montre que plus la chaîne latérale est encombrante, moins le dipeptide a tendance à s'autoassocier. Ainsi, on constate par exemple qu'à 3.10^{-4} mole/l, le composé A Phe EA

---

* Cette étude a été effectuée en collaboration avec Monsieur J. NEEL, Professeur à la faculté des Sciences de Nancy et Monsieur M. MARRAUD, Chargé de Recherche au C.N.R.S. dans le cadre de la R.C.P. n° 195.

Tableau III - Fréquences en cm^{-1} des vibrations de valence ν(N-H) et ν(N-D) des dipeptides en solution dans le tétrachlorure de carbone.

R_1	R_2	Aminoacide de départ	Notation abrégée	ν(N-H) "chélatés" C_7 (a)	ν(N-H) "chélatés" C_5 (b)	ν(N-H) "libres" L_β* (c)ou(d)	ν(N-H) "libres" L_α* (c)ou(d)	ν(N-D) "chélatés" C_7 (a)	ν(N-D) "chélatés" C_5 (b)	ν(N-D) "libres" L_β* (c)ou(d)	ν(N-D) "libres" L_α* (c)ou(d)
a) Type I : CH_3 - CONH - CHR_1 - CONH - R_2 (R_2 = CH_2 R')											
H	CH_3	Glycine	A Gly MA	3356	3421		3461	2498	2543		2568
CH_3	CH_3	D,L Alanine	A Ala MA	3350	3412	3443	3461				
$CH(CH_3)_2$	CH_3	D,L Valine	A val MA	3326	3422	3437	3461				
$(CH_2)_3$ - CH_3	CH_3	D,L Norleucine	A Nor MA	3348	3424	3444	3462	2484	2538		2568
$(CH_2)_2$ - S - CH_3	CH_3	L-Méthionine	A Met MA	3345	3426	3440	3460				
CH_2 - φ	CH_3	L-Phenylalanine	A Phe MA	3340	3421	3443	3454				
H	C_2H_5	Glycine	A Gly EA	3340	3417	3445	3460	2490	2538	2557	
CH_3	C_2H_5	D,L-Alanine	A Ala EA	3332	3416	3445		2482	2540	2558	
$CH(CH_3)_2$	C_2H_5	D,L-Valine	A val EA	3322	3423	3443					
$(CH_2)_3$-CH_3	C_2H_5	D,L-Norleucine	A Nor EA	3322	3418	3445		2480	2537	2557	
$(CH_2)_2$ - S - CH_3	C_2H_5	L-Méthionine	A Met EA	3332	3422	3442					
CH_2 - φ	C_2H_5	L-Phenylalanine	A Phe EA	3325	3421	3441					
b) Type II : CH_3 - $CON(CH_3)$ - CHR_1 - CONH - R_2 (R_2 = CH_2 R')											
H	C_2H_5	Sarcosine	A Sar EA	3355		3442		2490		2557	
c) Type III: CH_3 - CONH - CHR_1 - CON - $(R_2)_2$ (R_2 = CH_2 R')											
H	C_2H_5	Glycine	A $Gly(EA)_2$		3415		3460		2531		

* L_β et L_α désignent les absorptions dues aux groupements N-H libres respectivement avec ou sans substituant sur l'atome de carbone tétragonal en α.

est déjà sous forme monomoléculaire tandis qu'il faut atteindre $1,5.10^{-4}$ mole/litre avec A Met EA et 10^{-4} mole/litre avec A Gly EA pour observer, à 25° C, la disparition des espèces autoassociées et obtenir un profil spectral qui ne varie plus lors de dilutions ultérieures.

Lorsque la concentration est suffisamment faible pour que la solution ne contienne que des molécules isolées, le spectre présente selon le dipeptide, trois ou quatre bandes (fig. 11 partie gauche) dont les fréquences sont rassemblées dans le tableau III-a. Dans tous les cas, ces absorptions disparaissent totalement par deutériation sur les atomes d'azote. Elles correspondent donc à des vibrations mettant en jeu les liaisons N-H. Le fait que l'on observe au minimum trois absorptions ν(N-H) alors que les dipeptides ne contiennent que deux oscillateurs de ce type montre sans ambiguité que l'on est en présence d'un équilibre conformationnel. Pour tenter d'élucider ce phénomène, nous avons analysé les spectres des composés dipeptidiques modèles de types II et III (tableau III-b et III-c) qui dérivent des dipeptides de type I par substitution d'un radical alkyl (méthyl ou éthyl) sur l'un ou l'autre des atomes d'azote, N_1 et N_2. Ce "blocage" sélectif doit en effet faciliter l'identification des différentes absorptions ν(N-H).

211 - LIAISONS HYDROGENE INTRAMOLECULAIRES : MISE EN EVIDENCE DES CONFORMATIONS CHELATEES

Les spectres infrarouges des modèles A Gly $(EA)_2$ (type III) et A Sar EA (type II) sous forme monomoléculaire sont représentés sur la figure 12 dans la région des vibrations de valence ν(N-H). Leurs évolution par élévation de température suggère que les bandes situées vers 3415 cm^{-1} (A Gly $(EA)_2$) et 3360 cm^{-1} (A Sar EA) sont dues à des vibrateurs NH participant à des liaisons hydrogène intramoléculaires. Or, selon les critères stériques et énergétiques communément admis, cela implique que le modèle A Gly $(EA)_2$ puisse adopter une conformation totalement étendue et A Sar EA une conformation repliée favorisant l'existence de cycles de chélation respectivement à cinq chaînons (C_5) et à sept chaînons (C_7) comme l'indique le schéma de la page 45.

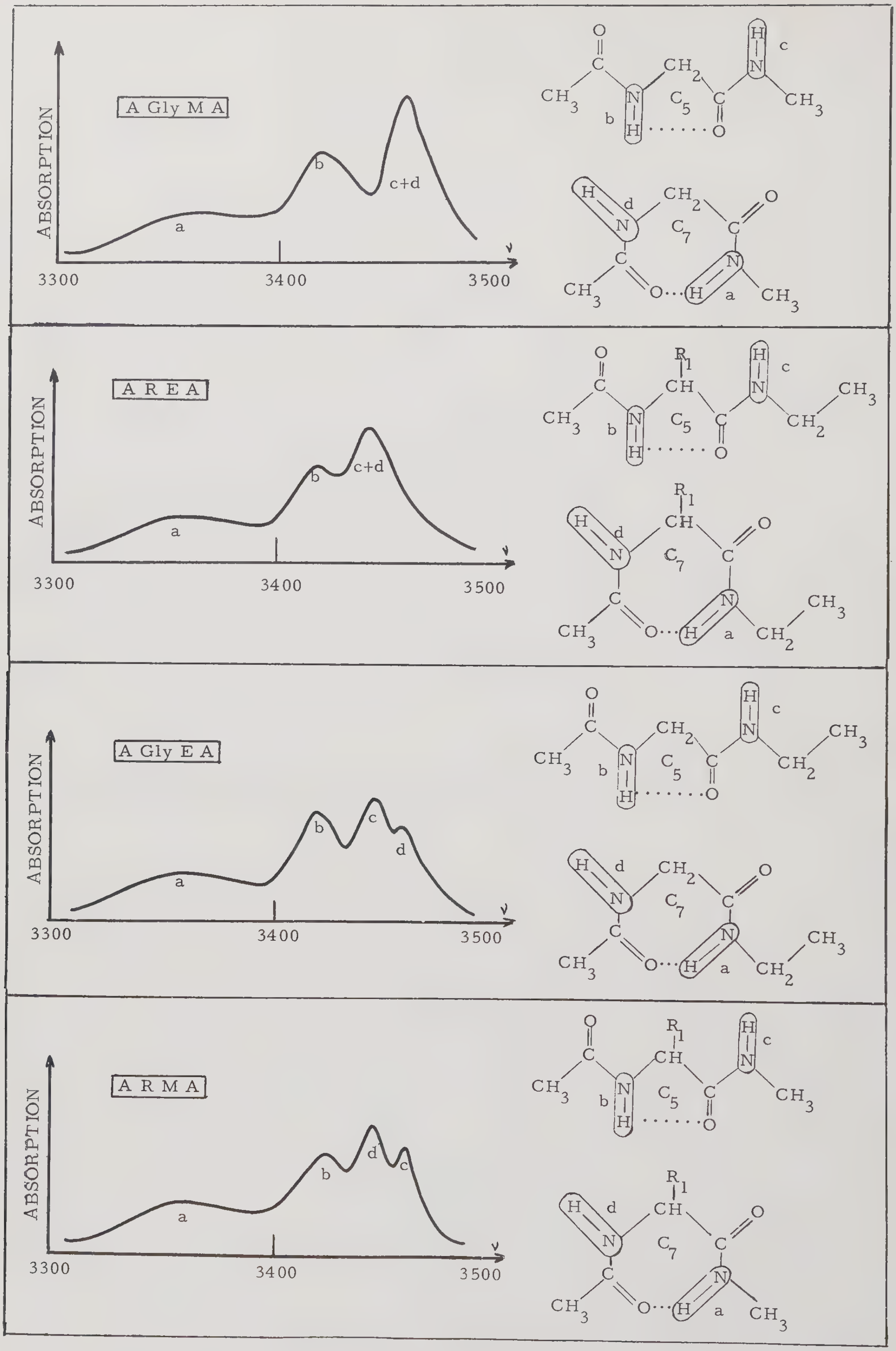
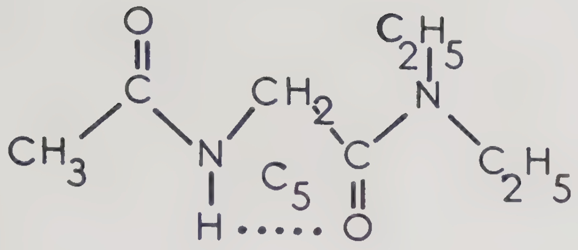
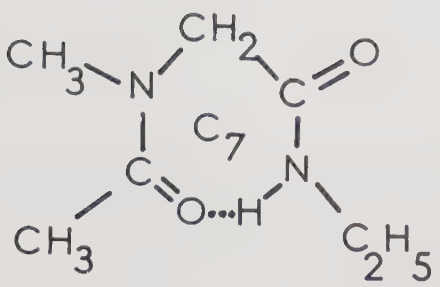


Fig. 11 : Attribution des absorptions infrarouges ν(N-H) des dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 en solution dans CCl_4.



Forme étendue C_5



Forme repliée C_7

Par conséquent, ceci nous conduit à situer la bande ν(N-H) chélatée en C_5 vers 3415 cm^{-1} et l'absorption ν(N-H) chélatée en C_7 vers 3360 cm^{-1}. On retrouve ces deux absorptions dans tous les spectres des dipeptides de type I. Cela suggère donc qu'ils présentent également les deux conformations étendue (C_5) et repliée (C_7) (figure 13). L'ensemble de ces résultats permet d'ores et déjà de rejeter l'attribution de MIZUSHIMA et coll.(10) selon laquelle l'absorption vers 3420 cm^{-1} correspondrait au vibrateur NH libre de la forme repliée des dérivés de type I. Nous venons effectivement de montrer que le composé A Gly $(EA)_2$ présente cette absorption bien qu'il soit dans l'impossibilité de se chélater sous la forme repliée (C_7).

Contrairement à la forme étendue C_5 qui est unique, le cycle de chélation C_7 est compatible avec l'existence de deux conformations repliées symétriques par rapport à la disposition $\phi = 0$, $\psi = 0$; ces deux formes se distinguent essentiellement par la situation du substituant R_1 relativement au plan moyen du cycle (fig. 13). Ainsi, dans l'une des conformations, R_1 occupe la position axiale (C_{7ax}) tandis qu'il occupe la position équatoriale (C_{7eq}) dans l'autre. Ces deux formes sont évidemment identiques dans le cas du résidu glycyl (R_1=H).

L'analyse spectroscopique des modèles de types II et III suggère en outre deux remarques. Les fréquences ν(N-H) de ces composés sont légèrement inférieures à celles que l'on observe dans le cas des dipeptides ; ce phénomène est compatible avec le fait que le groupe carbonyle appartenant à un motif amide tertiaire est plus basique que son homologue secondaire, ce qui entraîne une interaction plus importante sur le vibrateur NH chélaté. Enfin, le spectre de

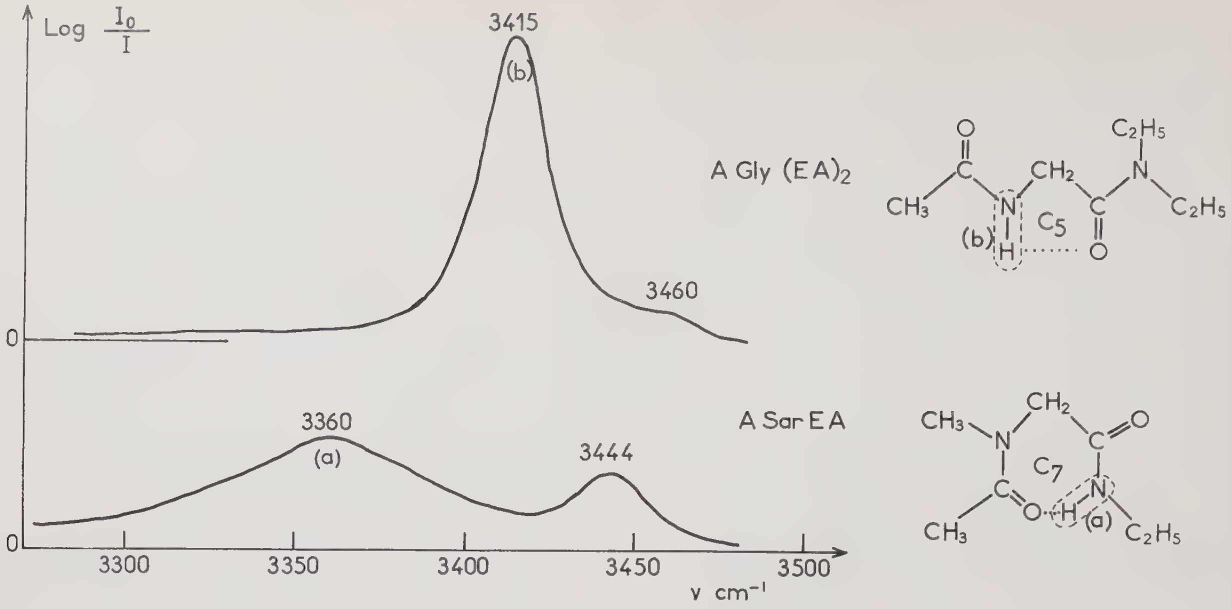


Fig. 12 : Absorptions infrarouges ν(N-H) des "dipeptides modèles" en solution dans CCl_4 ($C \simeq 10^{-4}$ mole/litre).

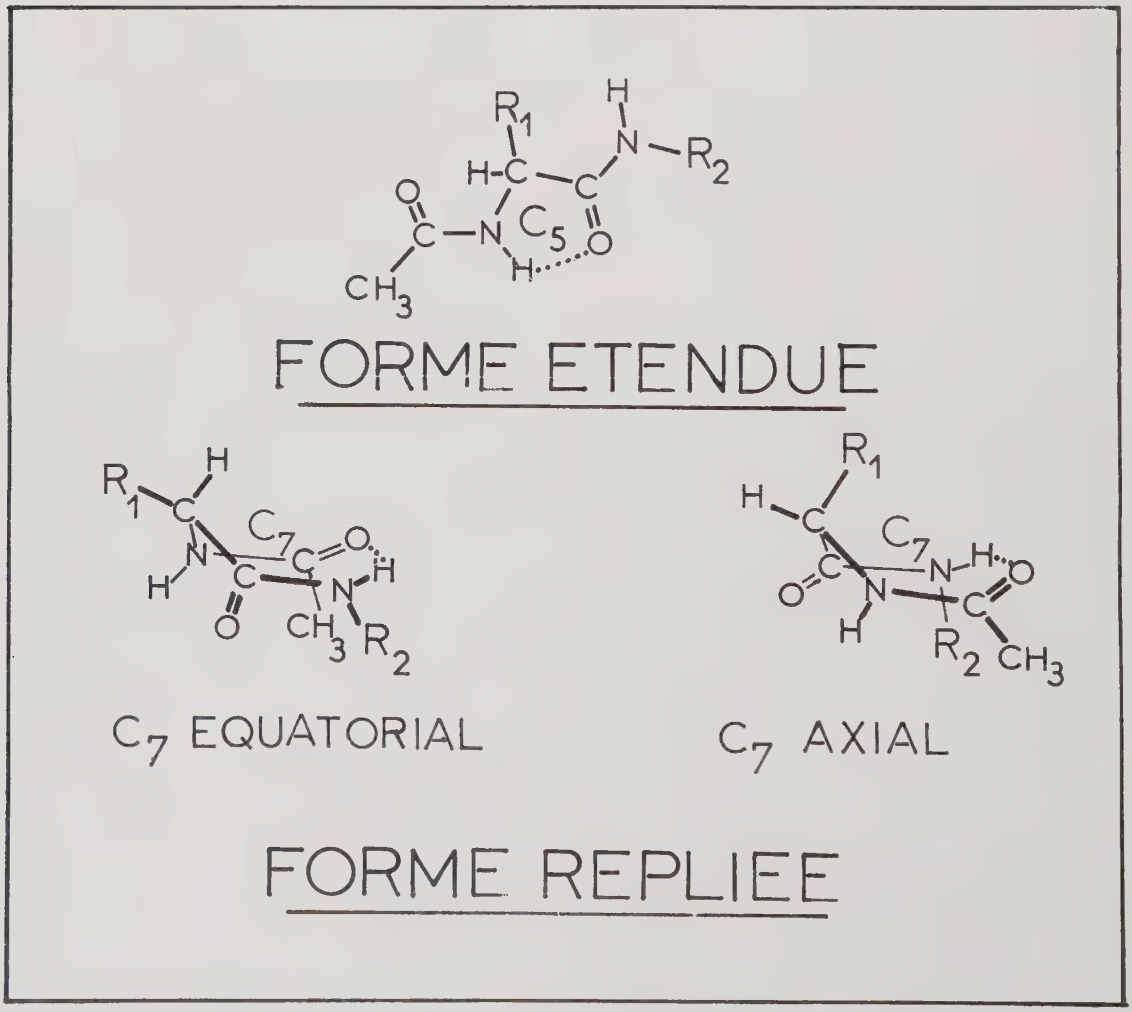


Fig. 13 : Conformations "chelatées" des dipeptides.

A Gly $(EA)_2$ (type III) présente vers 3460 cm^{-1} un faible épaulement dont l'intensité augmente par élévation de la température ; il correspond vraisemblablement au vibrateur NH libre d'une conformation semi-étendue provenant de la rupture de la chélation C_5.

Dans le cas des dipeptides de type I, on observe un phénomène comparable. En effet, quand la température augmente, l'intensité relative des deux bandes $\nu(N-H)_{C_5}$ et $\nu(N-H)_{C_7}$ diminue au profit du massif de haute fréquence (fig.14). Bien qu'il soit possible de proposer plusieurs interprétations à cette évolution, elles conduisent toutes à attribuer les deux absorptions situées au-dessous de 3450 cm^{-1} à des vibrateurs N-H "chélatés" et le massif étudié au-dessus de 3450 cm^{-1} à des vibrateurs N-H "libres" qu'il convient maintenant d'analyser.

212 - <u>INFLUENCE DE LA CHAINE LATERALE ET DU GROUPEMENT TERMINAL SUR LA FREQUENCE DES VIBRATEURS NH LIBRES.</u>

Le massif dû aux vibrateurs NH "libres" est constitué selon le cas d'une ou de deux absorptions (figure 11). Nous observons, en effet, une seule bande (L_α) vers 3460 cm^{-1} lorsqu'il n'y a pas de substituant alkyle sur les deux atomes de carbone tétragonaux (C_α) en alpha des liaisons NH, une seule bande ν(N-H) libre (L_β) vers 3445 cm^{-1} dans le cas contraire, enfin deux bandes vers 3460 (L_α) et 3445 cm^{-1} (L_β) lorsque l'un ou l'autre des atomes C_α porte un groupement alkyle (tableau III).

Ces résultats suggèrent que l'abaissement de l'ordre de 15 cm^{-1} (de 3460 à 3445 cm^{-1}) de la fréquence ν(N-H) résulte d'un effet de champ du groupement aliphatique substitué sur les atomes de carbone en alpha (C_α) et que cet effet est pratiquement équivalent pour la chaîne latérale et pour le groupement terminal.

Conformément à cette interprétation, on peut donc prévoir le nombre et la fréquence des absorptions ν(N-H) des dipeptides en fonction de la nature des radicaux R_1 et R' (avec $R_2 = CH_2$ R').

Ainsi, lorsque R_1 = R' = H (A Gly MA) les carbones tétragonaux en alpha des vibrateurs NH ne portent pas de groupement alkyle, donc les deux bandes ν(N-H) libres (c et d) sont superposées à 3460 cm^{-1}.

Lorsque $R_1 \neq$ H et R' $\neq$ H (AREA), les atomes C_α portent tous les deux un groupement alkyle ; on observe donc la superposition des deux absorptions ν(N-H) libres (c et d) vers 3445 cm^{-1}.

Quand R_1 = H et R' $\neq$ H (A Gly EA), la bande à 3460 cm^{-1} provient du vibrateur NH libre (d) de la forme repliée car l'atome C_α correspondant n'est pas

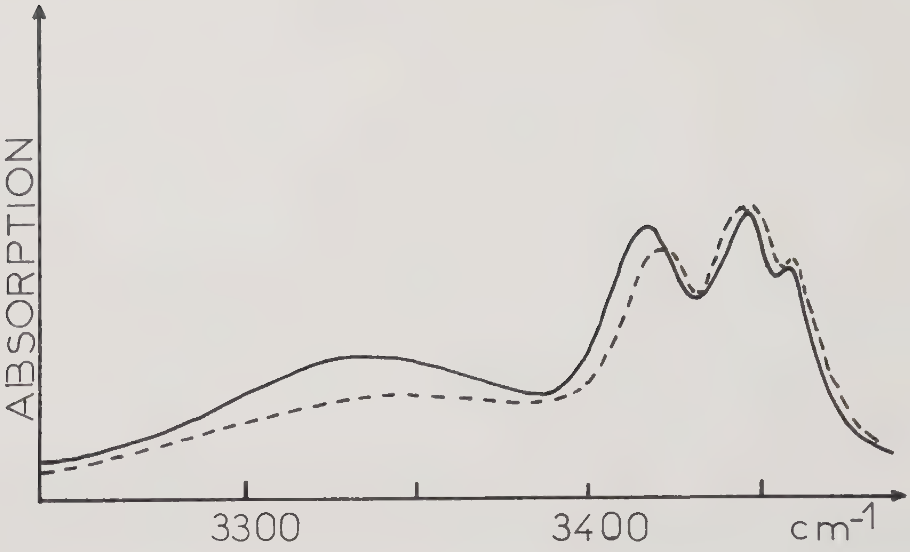


Fig. 14 : Influence de la température sur les absorptions ν(N-H) du dipeptide A Gly EA (CH_3-CONH-CH_2-CONH-C_2H_5) en solution dans CCl_4 (C ≃ 5.10^{-5} mole/litre ; cuve 10 cm)

—— : 10° C

---- : 70° C

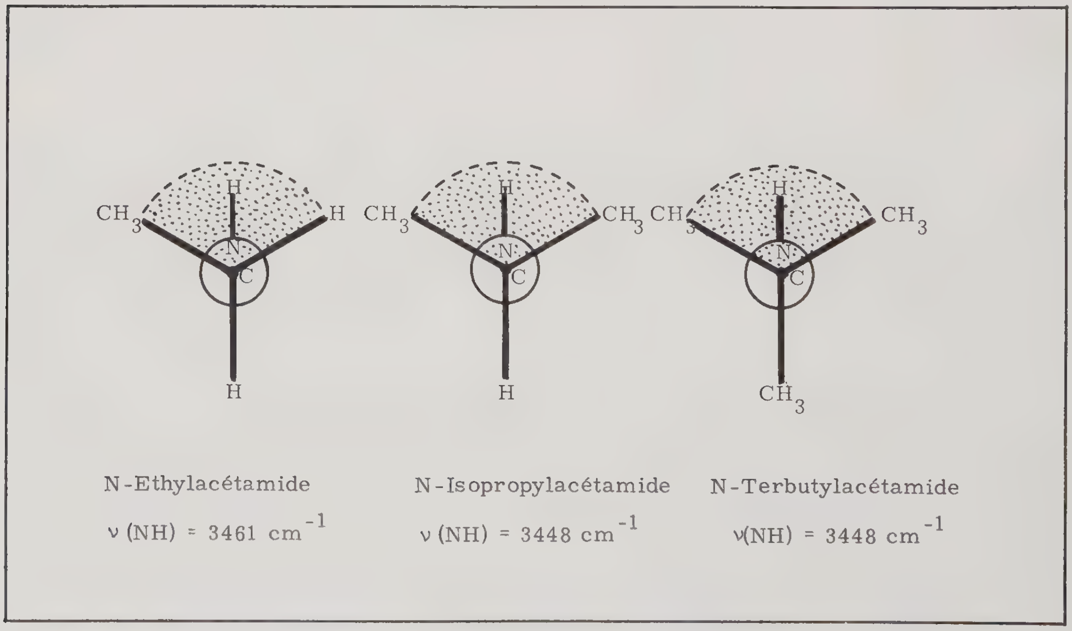


Fig. 15 : Positions des groupements "terminaux" par rapport à la liaison N-H dans les N-alkylacétamides.

substitué tandis que l'absorption à 3445 cm^{-1} est due au groupement NH libre (c) de la forme étendue,perturbé par le groupement alkyle porté par l'atome C_α voisin.

Enfin, dans l'éventualité $R_1 \neq H$ et $R' = H$ (ARMA), l'attribution précédente est inversée pour satisfaire à la même règle.

L'ensemble de cette systématique est résumé sur la figure 11. Elle s'applique également aux formes semi-étendues des composés modèles (fig. 12).

Signalons que par deutériation sur les atomes d'azote, on retrouve bien les positions relatives des bandes ν(N-D) libres (tableau III). Cependant, nous n'avons pas observé le dédoublement décrit précédemment par suite de l'élargissement anormal de ces bandes. Ce phénomène a déjà été rencontré dans le cas des alkylamides secondaires pour lesquels la largeur à la demi-intensité $\delta\nu_{1/2}$(N-H) est de l'ordre de 15 cm^{-1} alors que $\delta\nu_{1/2}$(N-D) est voisin de 35 cm^{-1} ; il est donc impossible, dans ces conditions, de séparer deux bandes ν(N-D) distantes d'une douzaine de cm^{-1} comme le laisserait prévoir l'effet isotopique.

213 - POSITION DE LA CHAINE LATERALE ET DU GROUPEMENT TERMINAL PAR RAPPORT AU SQUELETTE PEPTIDIQUE.

L'analyse de l'influence spectroscopique de ces effets de champ permet aussi de déterminer les positions relatives des chaînes latérales et du groupement terminal par rapport au squelette peptidique.

Considérons en effet le cas des dérivés ne possédant qu'un seul groupement CONH : les N-alkylacétamides CH_3-CONH-R. Lorsqu'on substitue successivement des groupements méthyles sur l'atome de carbone tétragonal en alpha par rapport à la liaison NH, ces substituants CH_3 peuvent a priori occuper un grand nombre de positions théoriquement équivalentes. En fait, le spectre infrarouge de ces composés en solution dans le tétrachlorure de carbone montre que le passage du N-méthylacétamide au N-éthylacétamide entraîne un abaissement de la fréquence ν(N-H) comme l'a déjà remarqué NYQUIST (47). Il en est de même lorsqu'on passe du N-éthylacétamide au N-isopropylacétamide. Ce fait montre que les deux substituants méthyles ont un effet équivalent sur le vibrateur NH. Par contre, l'introduction d'un troisième groupement CH_3 conduisant au N-terbutylacétamide ne provoque aucun effet notable sur la fréquence ν(N-H).

L'ensemble de ces résultats s'interprètent de manière cohérente si l'on admet que les alkylacétamides adoptent les conformations représentées sur la figure 15. Dans ces conditions, on constate que lorsqu'une liaison C_α - C_β se trouve à l'intérieur ou à la limite du secteur défini par les deux positions alternées, le substituant méthyle exerce un effet de champ qui se traduit par un

abaissement d'une quinzaine de cm^{-1} de la fréquence de vibration de valence ν(N-H) libre. En dehors de cette zone d'interaction, l'effet est négligeable. Signalons qu'un phénomène comparable a déjà été mis en évidence pour les vibrations ν(O-H) des alcools (48).

Dans le cas des dipeptides qui présentent essentiellement les deux conformations étendue et repliée, il est également possible de relier les effets spectroscopiques observés aux positions relatives des groupements R_1 et R' par rapport au plan moyen des cycles de chélation. Ainsi, pour le radical R', les critères restent les mêmes que pour le motif "terminal" d'un alkylamide. On déduit aisément que le groupement CH_3 de A Gly EA se situe en position gauche par rapport à la liaison NH de la forme étendue car on observe un abaissement de 15 cm^{-1} pour la vibration ν(N-H) libre lorsqu'on passe de A Gly MA à A Gly EA. Il est aussi évident que cet effet est masqué par une perturbation plus importante dans le cas du groupe NH chélaté de la forme repliée.

La même règle s'applique lorsqu'on considère la chaîne latérale. En ce qui concerne la conformation étendue (fig. 12), la chaîne R_1 se trouvant hors de la zone d'interaction précédemment définie, est sans effet sur le groupe NH voisin. Ceci montre en particulier que l'abaissement de fréquence d'une quarantaine de cm^{-1} observé pour le vibrateur engagé dans le cycle C_5 est dû uniquement à la liaison hydrogène.

Dans le cas de la forme repliée, l'effet spectroscopique observé implique que la chaîne latérale soit en position équatoriale par rapport au plan moyen du cycle (fig. 13). Une disposition axiale serait en effet incompatible avec les perturbations spectrales observées car alors la chaîne se situerait hors de la zone d'interaction.

214 - COMPARAISON DE NOS RESULTATS EXPERIMENTAUX AVEC CEUX DES CALCULS CONFORMATIONNELS THEORIQUES.

La mise en évidence des cycles de chélation C_5 et C_{7eq} à partir de nos résultats spectroscopiques souligne l'importance des liaisons hydrogène intramoléculaires parmi les interactions qui déterminent les conformations des dipeptides. La géométrie du cycle C_5 dans la disposition totalement étendue ($\phi \simeq -180°$, $\psi \simeq -180°$) est caractérisée par une liaison hydrogène relativement faible :

$$\text{distance } N_1 \ldots O_2 \simeq 2{,}70\ \text{Å}$$
$$\text{distance } H_1 \ldots O_2 \simeq 2{,}15\ \text{Å}$$
$$\text{angle } H_1N_1O_2 \simeq 50°$$

tandis que celle du cycle C_7 correspond à une liaison hydrogène forte :

distance $N_2 \ldots O_1 \simeq 2{,}70$ Å
distance $O_1 \ldots H_2 \simeq 1{,}75$ Å
angle $O_1N_2H_2 \simeq 23°$

Ces relations entre les paramètres géométriques des cycles de chélation et la force des liaisons hydrogène correspondantes doivent apparaître clairement sur le spectre. On attend en effet un abaissement de fréquence ($\Delta\nu$) d'autant plus important entre les absorptions ν(N-H) chélatées et ν(N-H) libres que le vibrateur est plus perturbé, c'est-à-dire que la liaison hydrogène est plus forte. C'est précisément ce que l'on observe puisque $\Delta\nu_{C_5}$ est de l'ordre de 40 cm^{-1} tandis que $\Delta\nu_{C_7}$ approche 100 cm^{-1}.

Bien qu'elle soit prépondérante, comme nous venons de le voir, la chélation n'est pas le facteur qui détermine à lui seul la stabilité de la conformation correspondante. Il faut également tenir compte des interactions stériques et dipolaires entre atomes non liés ainsi que des états rotationnels relatifs aux simples liaisons.

Ainsi, dans la conformation C_5, l'enchaînement principal est en complète extension et les répulsions stériques internes sont minimales. De plus, cet isomère possède un moment dipolaire théorique très faible (μ = 2,84 D) ce qui est bien compatible avec sa présence dans un solvant quasi inerte comme le tétrachlorure de carbone. Signalons aussi que cette forme correspond à un maximum du potentiel $V\phi$ autour de la liaison N-C_α tandis que $V\psi$ autour de C_α-C' est minimum. Rappelons enfin, que la forme étendue C_5 correspond à un minimum local dans les cartes conformationnelles calculées par les méthodes quantiques (35, 36, 40) tandis qu'elle est généralement exclue par les méthodes semi-empiriques exception faite toutefois des travaux de CRIPPEN et SCHERAGA (49).

Ainsi que nous l'avons déjà montré, les isomères C_{7ax} et C_{7eq} ne se distinguent que par la position relative de la chaîne latérale par rapport au cycle de chélation. Ils possèdent quasiment le même moment dipolaire puisque cette propriété ne fait intervenir en première approximation que les moments dipolaires des groupes CONH et leur orientation respective. Sa valeur (μ = 4,83D) étant relativement élevée par rapport à celle de la forme étendue, on peut attendre, si l'on tient compte uniquement de cet effet, à une stabilisation notable de l'isomère C_7 lorsque le solvant est polaire. Les conformations de type C_7 ont été prévues par la plupart des calculs quantiques (36, 50) et semi-empiriques (22, 49), mais l'ordre de stabilité relative des isomères C_{7ax} et C_{7eq} varie suivant les auteurs. Pourtant, un raisonnement simple fondé sur la comparaison du nombre de distances interatomiques anormalement courtes et sur la forme des potentiels

$V\phi$ et $V\psi$ intervenant dans ces deux isomères montre que la forme C_{7eq} est nettement favorisée. Cela est en accord avec nos observations. Enfin, d'une façon générale, il est clair que les résultats théoriques obtenus par PULLMAN et coll. (50) en utilisant la méthode quantique P.C.I.L.O. sont ceux qui se rapprochent le plus de nos résultats expérimentaux.

- Chapitre 2 -

CONFORMATION DES DIPEPTIDES ISOLES EN MATRICE D'ARGON

Jusqu'à ces derniers temps, la majeure partie des résultats obtenus par spectroscopie infrarouge en utilisant la technique des matrices concernait l'étude des radicaux libres, des associations moléculaires par liaison hydrogène et des molécules instables (51, 52). Pourtant, si l'on surmonte les difficultés technologiques liées à l'obtention des basses températures et à la maîtrise de l'isolation de l'espèce active, on dispose là d'une méthode très intéressante pour étudier les conformations moléculaires. En opérant de cette manière, on évite en effet les éclatements de bande de l'état cristallisé dûs aux actions intermoléculaires et les structures de vibration rotation de l'état gazeux (sauf pour les petites molécules telles que HCl, H_2O, NH_3, etc.). Par ailleurs, l'extrême finesse des bandes caractéristiques des spectres obtenus à basse température permet une analyse plus précise qu'à température ordinaire. Enfin, outre l'avantage d'obtenir des absorptions moins larges et mieux résolues, il est préférable d'opérer en matrice de gaz inerte plutôt qu'en solution car il est possible d'obtenir alors la totalité du spectre de l'espèce étudiée. Cet ensemble suffit à justifier l'intérêt de l'analyse conformationnelle des dipeptides en matrice que nous allons illustrer en considérant deux exemples particulièrement représentatifs : A Gly MA (R_1 = H) et A Ala MA (R_1 = CH_3).

221 - METHODE D'ANALYSE DES SPECTRES INFRAROUGES DES DIPEPTIDES EN MATRICE D'ARGON

L'étude d'un phénomène par spectroscopie infrarouge nécessite toujours l'attribution préalable des différentes absorptions observées. Dans le cas des grosses molécules, on effectue habituellement cette interprétation suivant l'approximation des vibrations de groupe. En effet, si théoriquement chaque mode normal fait intervenir un déplacement de tous les atomes de la molécule, on peut montrer que ces derniers ne vibrent pas tous avec la même amplitude et que pour une vibration donnée, la majeure partie de l'énergie potentielle est localisée dans un groupe d'atomes particulier. Il existe donc des vibrations caractéristiques correspondant aux différents groupes d'atomes d'une molécule. La vibration ν(N-H) que

avons analysée dans le chapitre précédent en constitue un exemple simple. Les vibrations caractéristiques d'un groupement d'atomes peuvent être situées de façon analogique en comparant les spectres de molécules possédant ce même groupement. Dans le cas des dipeptides, nous avons exploité ce critère d'attribution de deux manières différentes :

a) Comparaison des composés hydrogénés et N-deutériés :

Lorsqu'on substitue l'hydrogène par le deutérium sur un atome d'azote, on attend en premier lieu un déplacement de fréquence très important pour les absorptions propres de ce vibrateur et en second lieu une modification des couplages faisant intervenir les vibrations précédentes. Enfin, on prévoit également une perturbation au niveau des mouvements du squelette par suite de l'augmentation de la masse effective des groupements deutériés.

b) Comparaison avec des composés modèles :

Les spectres infrarouges de A Gly MA et A Ala MA hydrogénés et N-deutériés ont été comparés avec ceux des dérivés modèles NMA (CH_3-CONH-CH_3), A Sar EA (CH_3-CON(CH_3) - CH_2-CONH-C_2H_5) et A Gly $(EA)_2$ (CH_3-CONH-CH_2-CON$(C_2H_5)_2$) afin de faciliter d'une part l'attribution des bandes "amide" caractéristiques des groupes CONH "libres" (NMA) ou "chélatés" (A Sar EA, A Gly $(EA)_2$) et d'autre part celle des absorptions de bouts de chaîne CH_3(C) et CH_3(N) (NMA).

Enfin, l'attribution des bandes relatives au groupement méthylène central $C_\alpha H_2$ a pu être confirmée par comparaison avec le dérivé deutérié sur l'atome de carbone C_α central (A Gly MA - CD_2).

Outre ces deux procédés généraux d'attribution, on dispose dans le cas des études en matrice de critères spécifiques liés au mode opératoire.

c) Influence de la vitesse de dépôt de l'espèce active :

Si n_A et n_M désignent respectivement le nombre de molécules de substance active et de gaz inerte piégés par unité de temps, le rapport n_A/n_M représente la concentration du "soluté" dans la matrice. Par conséquent, pour un même débit de gaz inerte, le fait d'augmenter la vitesse de piégeage de A revient à augmenter également la concentration de la substance active. Dans ces conditions, l'évolution du spectre infrarouge par effet de concentration permet de distinguer les absorptions dues aux espèces autoassociées et les bandes provenant des molécules isolées.

d) Influence du recuit de la matrice

La technique du recuit consiste à élever progressivement la température de la matrice puis à "tremper" le système par un brusque retour à la température initiale de piégeage. On peut distinguer toutefois deux types de recuit. Dans le cas où l'on n'atteint pas les conditions de sublimation du gaz inerte, ce procédé conduit à un réarrangement de la structure de la matrice et permet l'attribution des absorptions dédoublées par "effet de site"*. Si, par contre, la température à laquelle le gaz inerte commence à se sublimer est atteinte ou même légèrement dépassée, on obtient non seulement l'effet précédent, mais on favorise également les associations moléculaires. Par conséquent, les modifications observées sur le spectre infrarouge après recuit fournissent de précieuses informations sur les absorptions dues aux effets de site et sur celles qui proviennent des espèces autoassociées.

222 - RESULTATS EXPERIMENTAUX ET ATTRIBUTIONS

Les spectres infrarouges de NMA, A Gly MA et A Ala MA hydrogénés et N-deutériés entre 1800 et 200 cm^{-1} sont représentés respectivement sur les figures 16 et 17. Nous avons rassemblé sur la figure 18 les spectres infrarouges de quelques dipeptides N-méthylés ($R_2 = CH_3$) et N-éthylés ($R_2 = C_2H_5$) ainsi que ceux des amides et dipeptides modèles dans la région des vibrations de valence ν(N-H). Enfin, les figures 19 et 20 représentent respectivement les spectres entre 1800 et 200 cm^{-1} des dipeptides modèles A Sar EA et A Gly $(EA)_2$ hydrogénés et N-deutériés.

Les attributions auxquelles nous avons été conduits en utilisant les critères définis précédemment sont résumés dans les tableaux IV, V et VI. Cette interprétation effectuée en étroite collaboration avec Y. GRENIE est discutée en détail dans sa thèse (53). Aussi, nous contenterons-nous ici d'en dégager plus particulièrement les informations susceptibles d'être interprétées en termes de conformation.

Auparavant, rappelons les notations en usage pour désigner les bandes "amide" à savoir : amide I : vibration de valence ν(C=O) ; amides II et III : vibration de déformation δ(N-H) couplée avec la vibration de valence ν(C'-N) peptidique ; amide II' : vibration de valence ν(C'-N) peptidique dans les composés N-deutériés ; amide III' : vibration de déformation δ(N-D) ; amide IV : vibration de déformation δ(C=O) ; amide V : vibration de déformation γ(N-H) ; amide V' :

---

* L'effet de site est lié au fait que dans les conditions habituelles de piégeage à 20 K, l'argon ne présente pas une phase cristalline unique. Par conséquent, toutes les molécules de "soluté" n'occupent pas des sites de substitution équivalents.

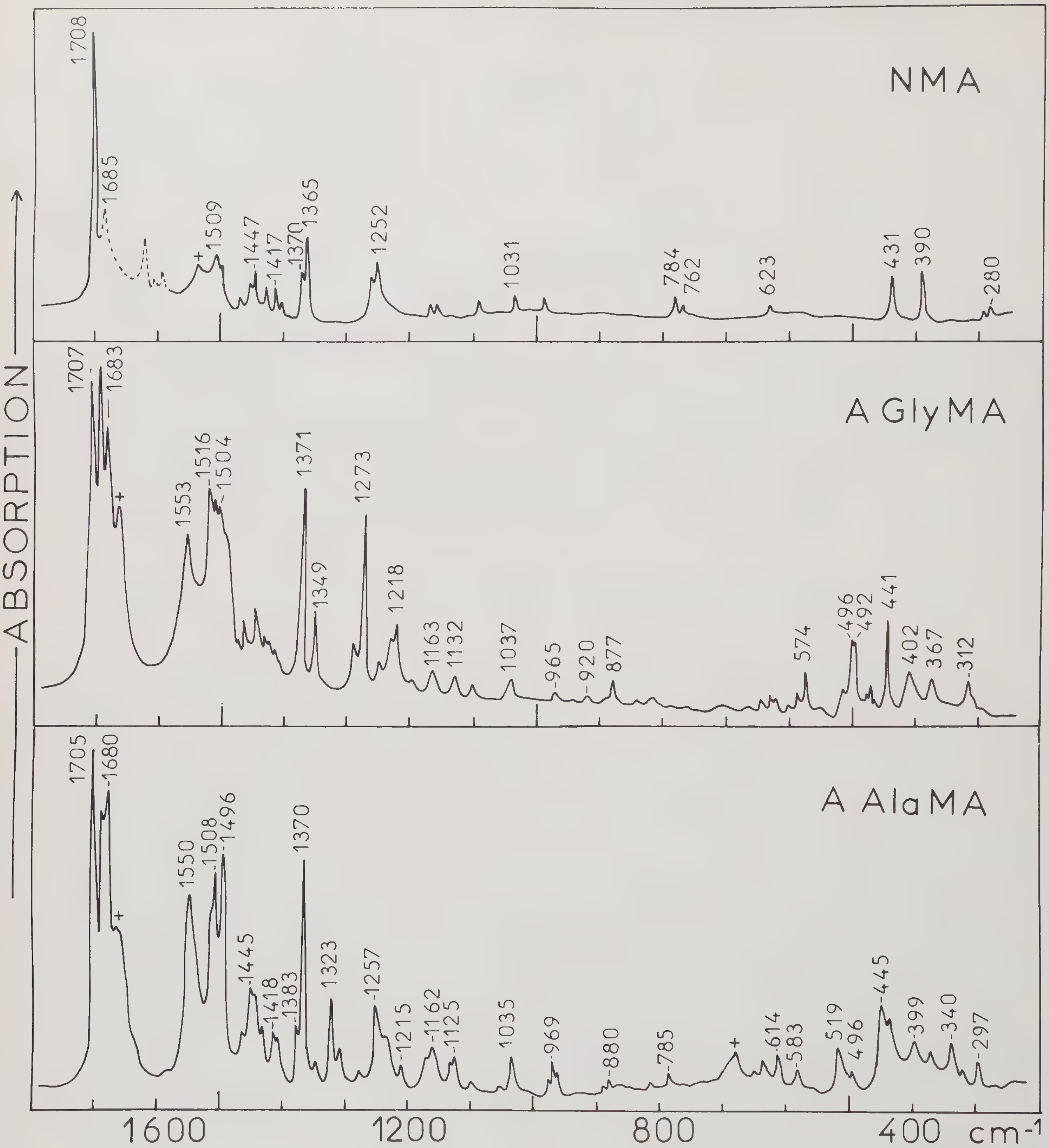


Fig. 16 : Spectres infrarouges de 1800 à 200 cm^{-1} de NMA, A Gly MA et A Ala MA isolés à 20 K en matrice d'argon.

----- : bandes dues à la présence d'eau dans la matrice

\+ : bandes dues aux espèces autoassociées.

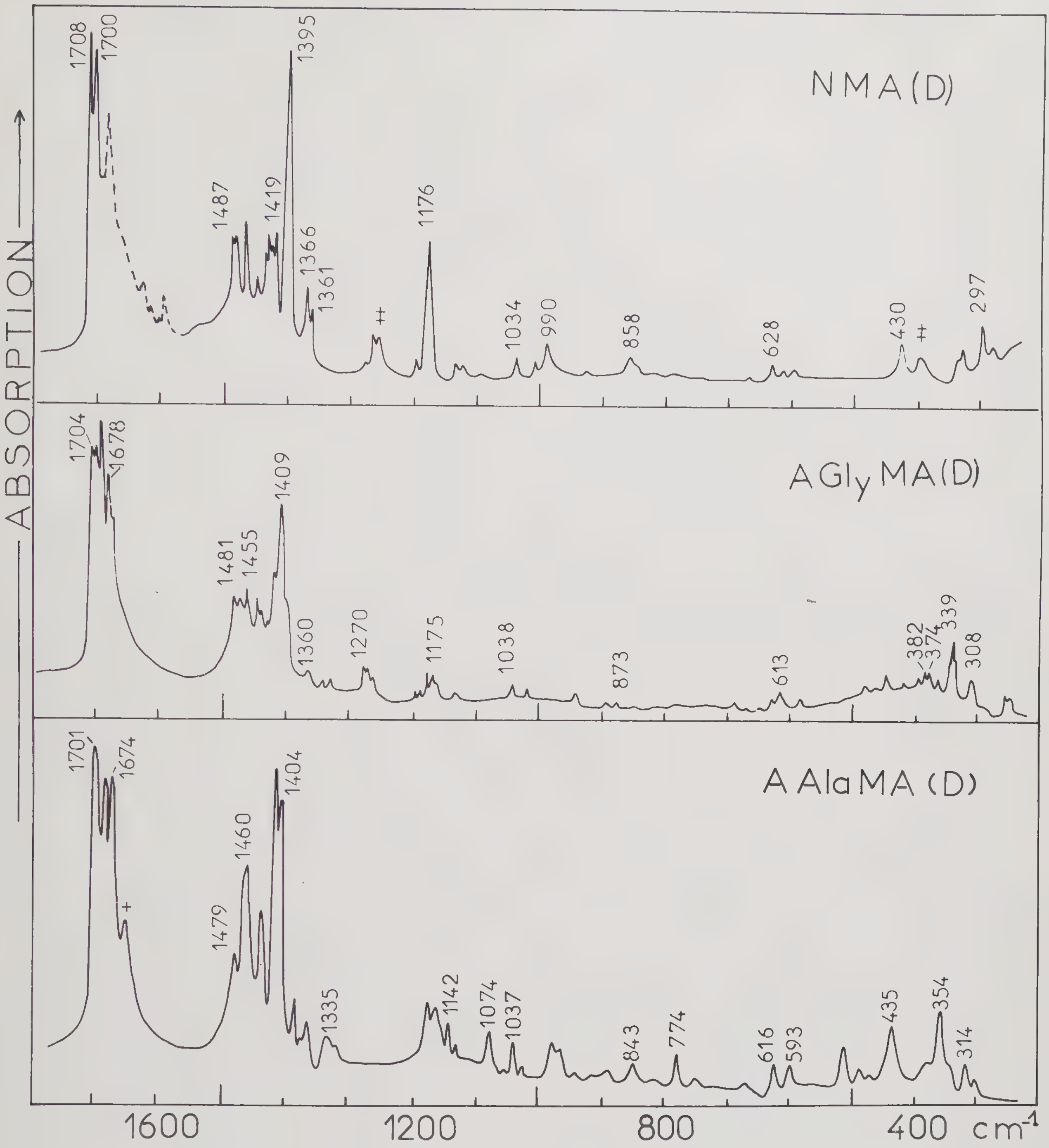


Fig. 17 : Spectres infrarouges de 1800 à 200 cm^{-1} de NMA, A Gly MA et A Ala MA N-deutériés isolés à 20 K en matrice d'argon.

---- : bandes dues à la présence d'eau dans la matrice

+ : bandes dues aux espèces autoassociées

‡ : bandes dues à un reste de molécules hydrogénées.

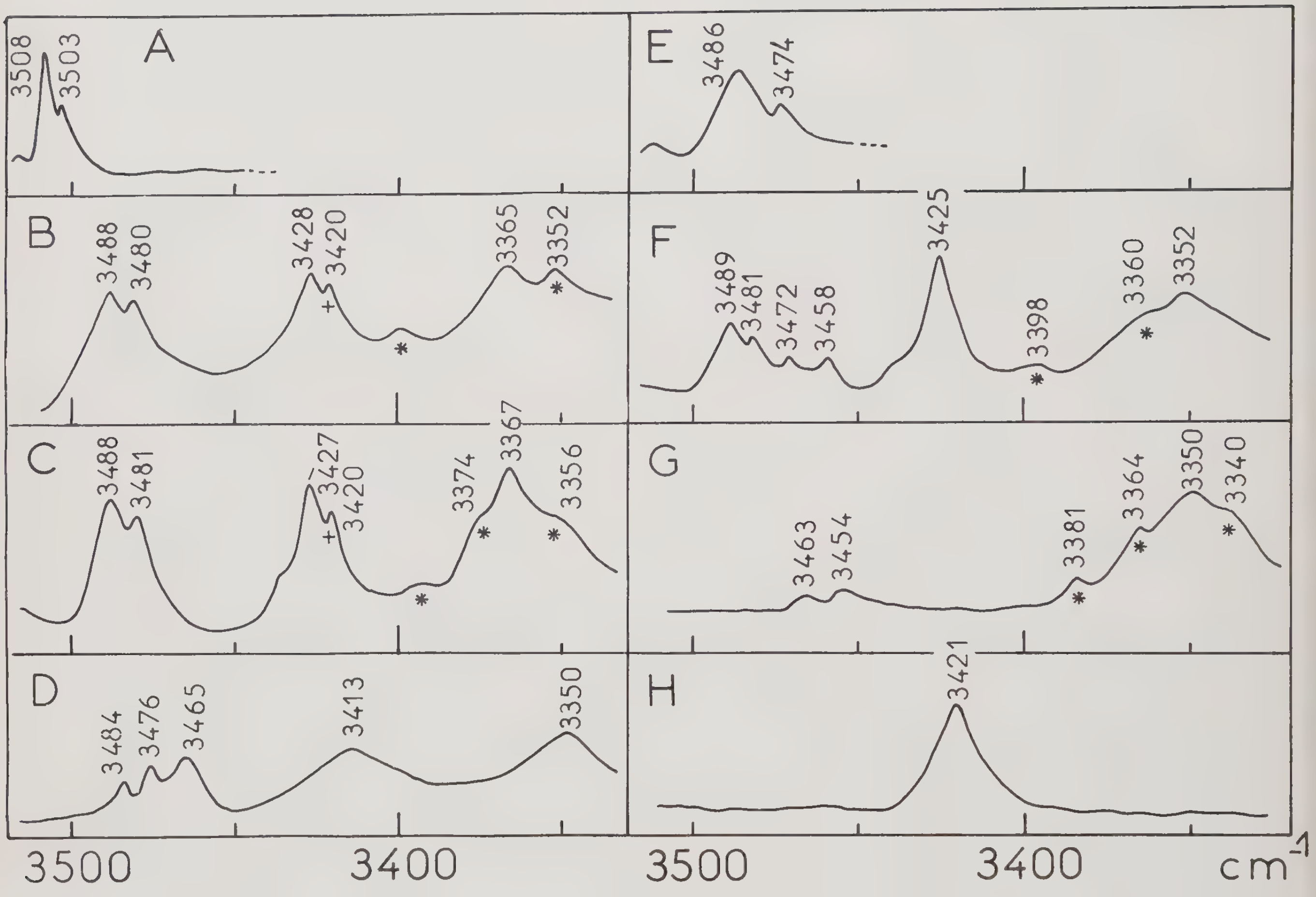


Fig. 18 : Absorptions infrarouges ν(N-H) de quelques dipeptides, amides et "dipeptides modèles" isolés à 20 K en matrice d'argon.

- A - CH_3-CONH-CH_3 (NMA)
- B - CH_3-CONH-CH_2-CONH-CH_3 (A Gly MA)
- C - CH_3-CONH-CD_2-CONH-CH_3 (A Gly MA(CD_2))
- D - CH_3-CONH-CH(CH_3)-CONH-CH_3 (A Ala MA)
- E - CH_3-CONH-C_2H_5 (NEA)
- F - CH_3-CONH-CH_2-CONH-C_2H_5 (A Gly EA)
- G - CH_3-CON(CH_3)-CH_2-CONH-C_2H_5 (A Sar EA)
- H - CH_3-CONH-CH_2-CON(C_2H_5)$_2$ (A Gly (EA)$_2$)

* : bandes dues aux espèces autoassociées

+ : bandes qui persistent après N-deutériation.

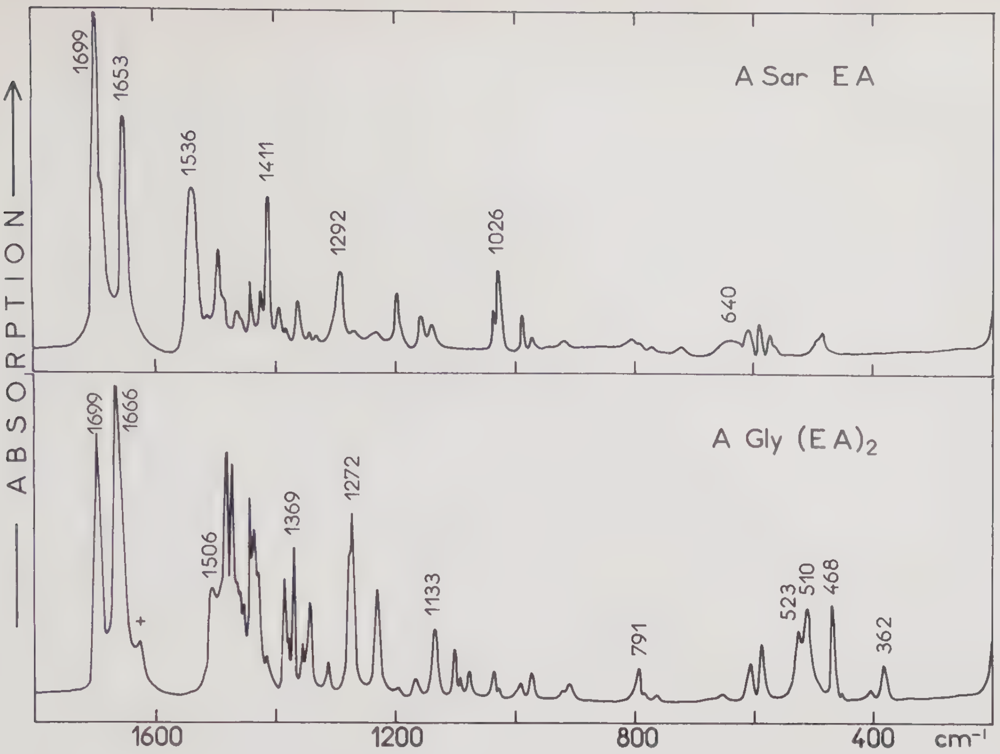


Fig. 19 : Spectres infrarouge de 1800 à 200 cm^{-1} des "dipeptides modèles" A Sar EA et A Gly $(EA)_2$ isolés à 20 K en matrice d'argon
+ : bandes dues aux espèces autoassociées.

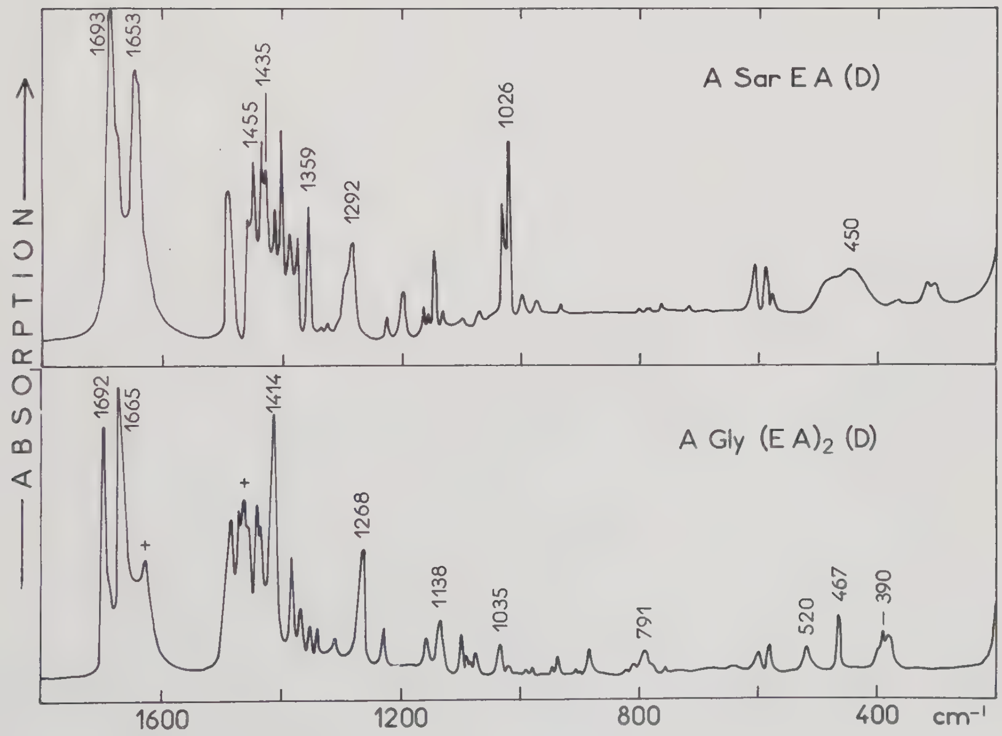


Fig. 20 : Spectres infrarouges de 1800 à 200 cm^{-1} des "dipeptides modèles" A Sar EA et A Gly $(EA)_2$ N-deutériés isolés à 20 K en matrice d'argon.
+ : bandes dues aux espèces autoassociées.

vibration de déformation γ(N-D) ; amide VI : vibration de déformation γ(C=O) et amide VII : vibration de torsion de la liaison C'-N peptidique. Par ailleurs, conformément aux notations de la figure 21, les indices a, b, c, d serviront à distinguer les motifs peptidiques.

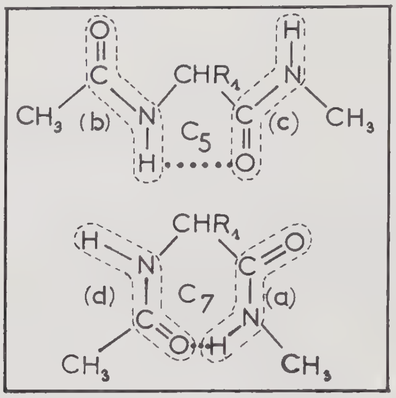


Fig. 21 : Notation des groupements "amide" dans les formes chelatées C_5 et C_7 des dipeptides.

a) Région des vibrations de valence ν(N-H)

Si l'on excepte le cas de la bande située vers 3420 cm^{-1} (A Gly MA et A Gly MA(CD_2)) toutes les absorptions situées entre 3500 et 3300 cm^{-1} disparaissent par N-deutériation. Elles correspondent donc à des vibrations de valence ν(N-H). Un recuit des matrices à 40 K nous a permis d'une part de mettre en évidence les bandes dues aux espèces autoassociées (notées ★ sur la figure 18) et d'autre part de renoncer à l'hypothèse du seul effet de site pour expliquer les dédoublements des absorptions ν(N-H) libres situées au-dessus de 3450 cm^{-1}.

Par contre, ces dédoublements semblables à ceux que l'on observe pour les alkylacétamides NMA (CH_3-CONH-CH_3) et NEA (CH_3-CONH-C_2H_5) peuvent s'interpréter si l'on admet, comme pour HCl (54) que certaines molécules libres interagissent à travers de minces couches d'argon. Il est fort probable en effet que de telles molécules puissent interagir de manière électrostatique étant donné le moment dipolaire important du groupement amide "trans" (≃ 3,7 D) (55).

Mis à part ces dédoublements, on constate que le massif correspondant aux monomolécules présente un profil spectral comparable à celui que l'on observe en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone. Dans ces conditions, compte tenu de l'influence prévisible du milieu et de la température sur les fréquences des maximums d'absorption, on est conduit à proposer une attribution analogue à celle qui a été effectuée en solution. De plus, la comparaison des spectres des dipeptides et des composés modèles A Sar EA et A Gly $(EA)_2$ confirme la coexistence dans la matrice des deux formes chélatées C_5 et C_7 et la position des absorptions $\nu(N\text{-}H)_a$ et $\nu(N\text{-}H)_b$ respectivement vers 3350 et 3425 cm^{-1}. Par ailleurs, on retrouve également en matrice l'effet d'abaissement de fréquence déjà signalé lorsqu'on substitue l'atome de carbone en alpha du vibrateur NH considéré et par conséquent la systématique proposée lors de l'attribution des bandes ν(N-H) libre des dipeptides en solution (fig. 11). Cet effet nous permet de montrer en particulier que A Ala MA présente, en matrice, la forme C_7 équatoriale (fig. 13) caractérisée par la bande à 3465 cm^{-1}. Toutefois, nos arguments concernant l'attribution des absorptions dédoublées situées au-dessus de 3470 cm^{-1} sont insuffisants pour exclure d'une part l'éventualité de formes non chélatées pour les dipeptides en général et d'autre part celle de la disposition C_7 axiale dans le cas particulier de A Ala MA.

<u>Tableau IV</u> : Fréquences (cm^{-1}) des absorptions ν(NH) des dipeptides et des composés modèles isolés à 20 K en matrice dans l'argon.

COMPOSE	$\nu(NH)_a$ *	$\nu(NH)_b$	$\nu(NH)_c$	$\nu(NH)_d$	ν(NH) libre
NMA					3508-3503
A Gly MA	3365	3428	3488-3480	3488-3480	
A Gly MA (CD_2)	3367	3427	3488-3481	3488-3481	
A Ala MA	3350	3413	3484 - 3476 - 3465		
NEA					3486-3474
A Gly EA	3352	3425	3472-3458	3489-3481	
A Sar EA	3350				3463-3454
A Gly $(EA)_2$		3421			

* Notation de la figure 21.

Tableau V : Attribution des absorptions Amide I, II et V des dipeptides et des composés modèles hydrogénés isolés à 20 K en matrice dans l'argon.

* Fréquences en cm^{-1}

** Notations de la figure 21.

ABSORPTIONS	NMA	**	AGlyMA	AGlyMA(CD_2)	AAlaMA	ASar EA	AGly($EA)_2$
Amide I	1708*	a	1707	1709-1702	1705	1699	-
		b	1707	1709-1702	1705	-	1696
		c	1693	1692	1688	-	1666
		d	1683	1681	1680	1653	-
Amide II	1509 1503	a	1553	1551	1550	1536	-
		b	1516-11-04	1504	1508	-	1506
		c	1496	1496	1496	-	-
		d	1516-11-04	1504	?	-	-
Amide V	390	a	∿ 640	∿ 660	∿ 630	640	-
		b	496-492	496-491	519	-	510
		c	402	397	399	-	-
		d	402	397	399	-	-

Tableau VI : Attribution des absorptions amide I, II' et V' des dipeptides et des composés modèles N-deutériés isolés à 20 K en matrice dans l'argon.

* Fréquences en cm^{-1}

** Notations de la figure 21.

ABSORPTIONS	NMA	**	AGlyMA	AGlyMA(CD_2)	AAlaMA	ASarEA	AGly($EA)_2$
Amide I	1708- 1700*	a	1704-1699	1701-1694	1701-1698	1693	-
		b	1704-1699	1701-1694	1701-1698	-	1692
		c	1691	1689	1685	-	1665
		d	1678	1676	1674	1653	-
Amide II'	1395	a	1455	1461	1460	1455 ou 1435	-
		b	1416-1409	1414-1404	1412-1404	-	1414
		c	1416-1409	1414-1404	1412-1404	-	-
		d	1481	1481	1479	-	-
Amide V'	297	a	∿ 450	?	∿ 435	450	-
		b	382-374	391-373	354	-	390
		c	308	302	314	-	-
		d	308	302	314	-	-

b) Bandes amide I

Depuis les travaux de FILLAUX et coll.(56), on sait que la fréquence de la bande amide I dépend non seulement de l'environnement du vibrateur C=O mais aussi de celui du groupe NH contigu. Or, dans l'hypothèse de la coexistence des formes C_5 et C_7 les différents groupements carbonyle sont tantôt chélatés (c et d) tantôt contigus à un vibrateur NH chélaté (a et b). Il y a donc quatre types de vibrateurs C=O et l'on peut s'attendre à trouver quatre bandes amide I.

Dans la pratique, on observe pour A Gly MA et A Ala MA hydrogénés un massif comprenant trois composantes. Par comparaison avec NMA, nous attribuons l'absorption située vers 1705 cm^{-1} aux vibrateurs C'=O "libres" (a et b). Les deux bandes de basses fréquences vers 1690 et 1680 cm^{-1} s'interprètent alors comme étant dues respectivement aux groupes chélatés $C'=O_c$ de la forme C_5 et $C' = O_d$ de la forme C_7. Cette attribution est compatible avec la force relative de ces deux types de chélation d'autant plus que la différence de fréquence ($\Delta\nu$ = 10 cm^{-1}) observée entre ces deux absorptions correspond bien à celle relevée dans le cas des molécules modèles A Gly $(EA)_2$ et A Sar EA. Signalons à cet égard que les groupes C'=O chélatés de ces derniers composés appartiennent à des motifs amide tertiaire, tandis que ceux des dipeptides appartiennent à des motifs amide secondaire dont les fréquences ν(C=O) sont attendues différentes. C'est pourquoi, il n'est pas possible dans cette région de rapprocher les fréquences intrinsèques des bandes homologues des dipeptides et des molécules modèles. Par contre, la quantité $\Delta\nu$ demeure parfaitement significative des deux modes de chélation.

Dans le cas de A Gly MA et A Ala MA N-deutériés, on observe un dédoublement de l'absorption de haute fréquence attribuée aux vibrateurs C'=O libres. Nous ne sommes pas en mesure de proposer une explication entièrement satisfaisante à ce phénomène. Cependant, il ne semble pas provenir d'un effet conformationnel puisque NMA N-deutérié présente également un massif dédoublé. Dans ces conditions, toutefois, la multiplicité des bandes observées nous empêche, à ce stade de l'analyse, d'exclure la possibilité de l'existence dans la matrice d'une forme semi-étendue sans chélation en plus des isomères C_5 et C_7.

c) Bandes amide II

Ces bandes doivent disparaître par N-deutériation. Elles sont en outre particulièrement sensibles à l'état d'association du groupement NH. Par le jeu conjugué de ces deux critères, l'attribution des bandes amide II est simple (tableau V). Cependant, la multiplicité des composantes de ce massif pose une fois encore le problème du nombre d'isomères coexistant dans la matrice. Notons enfin que le spectre de NMA présente également une bande dédoublée dans cette région.

d) Bandesamide II'

A notre connaissance, il n'existe aucune analyse systématique de l'évolution de la fréquence de cette absorption par association. En effet, les solvants habituellement utilisés pour de telles études absorbent dans cette région. Cependant, les travaux de GRENIE effectués en solide à différentes température et en matrice (53, 57) suggèrent que la fréquence de la bande amide II' est affectée à la fois par l'association sur les groupes donneurs (NH) et accepteurs (C=O) contigus. Par conséquent, le raisonnement développé dans le cas de la bande amide I s'applique également ici. On peut penser en particulier que la fréquence d'une bande amide II' appartenant à un motif CONH non chélaté doit être très proche de celle de NMA (1395 cm^{-1}); or toutes les bandes amide II' des dipeptides sont observées à des fréquences supérieures. Dans ces conditions, il semble que tous les groupements CONH des dipeptides sont chélatés. On est alors obligé d'admettre qu'un tel résultat est incompatible avec la présence éventuelle d'une forme semi-étendue et que seules les formes C_5 et C_7 coexistent dans la matrice. Il faut noter enfin que l'absorption due au mouvement de déformation $\delta_s(CH_3)N$ participe vraisemblablement à l'intensité de la bande située vers 1410 cm^{-1}.

e) Bandes amide V et V'

L'évolution des spectres de NMA et A Gly $(EA)_2$ par N-deutériation permet de proposer une attribution pour les bandes amide V et V' correspondant aux vibrateurs NH et ND libres ou engagés dans le cycle de chélation C_5. Par contre, en ce qui concerne la conformation C_7, les résultats obtenus avec A Sar EA suggèrent que les bandes amide V et V' doivent être larges et peu intenses, ce qui complique évidemment leur identification (53).

Il faut souligner toutefois l'extrême sensibilité de ces vibrations à l'association par liaison hydrogène. En effet, pour A Gly MA par exemple, les

chélations C_5 et C_7 entraînent respectivement une élévation de fréquence ($\Delta\nu$) d'environ 100 et 240 cm^{-1} alors que dans la région des vibrations de valence ν(NH) ces déplacements ne sont que de 60 et 120 cm^{-1}. On constate donc que les rapports $\Delta\nu_{C_5}/\Delta\nu_{C_7}$ demeurent sensiblement constants mais que les vibrations de déformation hors du plan (γ) sont beaucoup plus sensibles à la chélation que les vibrations de valence (ν).

223 - DISCUSSION DES RESULTATS

L'analyse des résultats infrarouges obtenus en appliquant la technique des matrices aux dipeptides appelle de nombreux commentaires. Il est maintenant établi que ce mode opératoire permet de réaliser une isolation convenable des molécules de taille relativement importante au sein d'un milieu totalement inerte et transparent, ce qui constitue un progrès très net par rapport aux études en solutions. Par ailleurs, nous avons été en mesure de suivre région par région le comportement des bandes amides lorsque celles-ci sont perturbées par des liaisons hydrogènes intramoléculaires de types différents.

L'interprétation de l'ensemble des spectres suggère d'une part que seules les deux conformations chélatées C_5 et C_7 coexistent dans la matrice et d'autre part que A Ala MA présente la forme C_{7eq}. Par contre, nous n'avons pu ni confirmer ni exclure la disposition C_{7ax}. Dans ces conditions, il semble évident que les conformations C_5 et C_7 possèdent toutes deux une grande stabilité intrinsèque puisqu'on les retrouve aussi bien en solution dans le tétrachlorure de carbone qu'en matrice dans l'argon.

D'un point de vue plus général, l'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible, en utilisant la technique des matrices de tremper un équilibre conformationnel haute température et de l'étudier lorsqu'il est métastable. Il est très vraisemblable, en effet, que si le système constitué par le gaz d'isolement et le dipeptide pouvait atteindre l'équilibre thermodynamique, on n'observerait qu'une seule forme à 20 K. Il est important à cet égard de bien faire la différence entre les informations obtenues en solution dans le tétrachlorure de carbone et en matrice dans l'argon. Dans le premier cas, les deux isomères de rotation C_5 et C_{7eq} sont en équilibre à 25°C tandis qu'ils coexistent selon un état métastable à 20 K dans le second. Par conséquent, s'il est possible de comparer directement les résultats expérimentaux obtenus par la technique des matrices avec ceux des calculs conformationnels théoriques, cette comparaison doit être exclusivement qualitative. On peut effectivement savoir si les conformations expérimentales correspondent à des minima locaux des diagrammes calculés, mais il

serait illusoire de tenter une évaluation de leur stabilité relative à partir de l'expérience puisque alors le système n'est pas thermodynamiquement défini (en particulier, on ne connait pas la température à laquelle existe l'équilibre piégé).

En résumé, la technique des matrices constitue un moyen privilégié d'analyse conformationnelle par spectroscopie infrarouge, mais elle est limitée au domaine qualitatif.

- Chapitre 3 -

DOSAGE DES FORMES "ETENDUE" (C_5) ET "REPLIEE" (C_7)

L'interprétation des spectres infrarouges des dipeptides tant en solution dans le tétrachlorure de carbone qu'en matrice d'argon a montré que ces molécules adoptent essentiellement les conformations "étendue" (C_5) et "repliée" (C_7). Il parait, en effet, peu vraisemblable qu'il existe une conformation semi-étendue sans chélation en quantité appréciable dans la solution. Cette hypothèse est compatible avec les résultats que nous avons obtenus en matrice d'argon et selon lesquels seules les formes C_5 et C_7 coexistent. Dans ces conditions, il nous a semblé intéressant de dépasser le stade de l'analyse qualitative et de rechercher une méthode de dosage permettant d'évaluer la proportion des isomères de rotation C_5 et C_7 à l'équilibre lorsque les dipeptides sont dissous dans le tétrachlorure de carbone.

231 - PRINCIPE DE LA METHODE

Rappelons qu'en solution très diluée (voisine de 10^{-4} mole/l) dans le tétrachlorure de carbone, les dipeptides ne sont plus autoassociés et présentent trois ou quatre bandes ν(N-H) selon la nature des radicaus R_1 et R_2 (fig. 11). On distingue cependant six types d'absorption d'où six coefficients d'extinction molaire caractéristiques (tableau VII).

Tableau VII : Coefficients d'extinction molaire ε des dipeptides.

Coefficients d'extinction molaire	Caractéristiques du vibrateur mis en jeu	Dipeptides présentant ce type de bande	valeur numérique. $l.mole^{-1}\ cm^{-1}$
ε_a	N-H chélaté en C_7	tous	?
ε_b	N-H chélaté en C_5	tous	135
ε_{c_α}	N-H libre de la forme étendue avec C_α non substitué	A Gly MA A R M A	266
ε_{c_β}	N-H libre de la forme étendue avec C_α substitué	A Gly EA A R E A	166
ε_{d_α}	N-H libre de la forme repliée avec C_α non substitué	A Gly MA A Gly EA	100
ε_{d_β}	N-H libre de la forme repliée avec C_α substitué	A R M A A R E A	117

Comme dans tous les dosages effectués par spectroscopie d'absorption, nous supposons que le coefficient d'extinction molaire ε de chaque bande ν(N-H) est indépendant de la proportion des différents isomères de rotation en équilibre dans la solution.

Rappelons que $\varepsilon_\nu = D_\nu/C.l$, D_ν étant la densité optique de la bande considérée à la fréquence ν, c la concentration en mole/litre et l la longueur de la cuve en centimètres. Nous supposerons, en outre, que le même type de vibrateur NH possède le même coefficient d'extinction molaire pour les différents dipeptides de structure très voisine.

Comme il existe essentiellement deux conformères en équilibre, il nous suffit pour doser l'un d'entre eux, de connaître le coefficient ε_ν au maximum de l'une de ses bandes caractéristiques. Or, parmi les différents types de coefficient d'extinction molaire que nous venons d'examiner, les quatre derniers (tableau VII) sont inutilisables directement car il n'est pas possible d'atteindre leur valeur intrinsèque à partir d'une mesure absolue. Par conséquent, il nous reste le choix entre ε_a et ε_b. Le composé modèle A Gly $(EA)_2$ fournit une solution à ce problème. En effet, il n'existe pratiquement que sous la forme

étendue et son spectre ne présente qu'une seule bande $\nu(N-H)_b$ vers 3415 cm^{-1} (fig. 12). Nous en avons donc déduit la valeur de ε_b (tableau VII). Le dosage s'effectue alors de la manière suivante : à l'aide de ε_b on calcule la quantité de forme étendue grâce à la mesure de la densité optique de l'absorption $\nu(N-H)_b$ du dipeptide considéré. On évalue ensuite la quantité du conformère replié par différence.

Dans l'évaluation des erreurs que l'on peut attendre d'une telle méthode, nous avons tout d'abord négligé les erreurs gravimétriques liées à la préparation des solutions. Nous avons par contre tenu compte d'une part de l'incertitude sur la courbe donnée par le spectromètre (bien que celui-ci ait été soigneusement étalonné en absorption) et d'autre part et surtout de l'erreur liée à la décomposition graphique du massif d'absorption. Signalons à ce propos que c'est précisément la bande $\nu(N-H)_b$ utilisée pour le dosage qui est la moins affectée par le recouvrement des bandes voisines. Un calcul d'incertitude effectué dans ces conditions conduit à des erreurs de ± 15 % sur la proportion des deux isomères de rotation.

232 - APPLICATION DE LA METHODE

Nous avons effectué le dosage des deux formes étendue et repliée pour une série de dipeptides (R_1 aliphatique) sélectionnés en fonction de l'encombrement de leur chaîne latérale (tableau VIII). Ces composés qui présentent suivant le cas trois ou quatre bandes nous ont permis également de vérifier l'autocohérence de la méthode.

Tableau VIII : Pourcentages des formes étendue (C_5) et repliée (C_7) pour les dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 en solution dans CCl_4*.

Dipeptides	C_5 %	C_7 %
A Gly $(EA)_2$	100	
A Gly MA	40 ± 15	60 ± 15
A Gly EA	52 ± 15	48 ± 15
A Ala EA	26 ± 15	74 ± 15
A Val EA	25 ± 15	75 ± 15
A Nor MA	30 ± 15	70 ± 15

* $c = 1,5 \times 10^{-4}$ mole/l ; t = 50° C.

a) Dipeptides présentant quatre bandes ν(N-H)

Les solutions de A Gly EA et ARMA sont suffisantes pour examiner les six types d'absorption décrits précédemment. La mesure de la densité optique de l'absorption $\nu(N\text{-}H)_b$ nous permet dans les deux cas de calculer les pourcentages des formes étendue et repliée. De plus, à partir des résultats de ces dosages, nous avons pu évaluer avec une bonne précision les coefficients d'extinction molaire caractéristiques de chaque type de bandes libres (tableau VII). Ainsi, les valeurs de $\varepsilon_{c\beta}$ et $\varepsilon_{d\alpha}$ ainsi que celles de $\varepsilon_{c\alpha}$ et $\varepsilon_{d\beta}$ proviennent respectivement des dipeptides A Gly EA et A Nor MA. Signalons que nous avons choisi ce dernier composé pour représenter les dipeptides de type général ARMA dans le but d'évaluer les coefficients d'extinction molaire ε avec le maximum de précision. En effet, parmi les dipeptides que nous avons étudiés, c'est A Nor MA qui présente le massif ν(N-H) le mieux résolu. Enfin, il convient de noter que les valeurs des coefficients d'extinction molaire ε des absorptions ν(N-H) libre des dipeptides et des amides secondaires sont du même ordre de grandeur ($\simeq$ 100 l.mole^{-1} cm^{-1}). On retrouve en outre le même phénomène d'exaltation du coefficient ε lorsqu'on considère les bandes c_α et c_β des dipeptides ($\varepsilon_{c\alpha}$ = 266, $\varepsilon_{c\beta}$ = 166, $\varepsilon_{c\alpha}/\varepsilon_{c\beta}$ = 1,6) et des amides secondaires ($\varepsilon_{c\alpha}$ = 102 dans NMA, $\varepsilon_{c\beta}$ = 67 dans NEA, $\varepsilon_{c\alpha}/\varepsilon_{c\beta}$ = 1,6).

b) Dipeptides présentant trois bandes ν(N-H).

C'est le cas de A Gly MA et des dipeptides de type général AREA. Nous avons déterminé comme précédemment la proportion des formes étendue et repliée par la mesure de la densité optique de l'absorption $\nu(N\text{-}H)_b$. Ensuite, connaissant d'une part la concentration c et d'autre part les coefficients d'extinction molaire ε des différents types de bandes libres déterminés selon la méthode décrite au paragraphe précédent, nous avons pu, a priori, évaluer le profil des spectres résultants. Ainsi, nous avons calculé pour AREA la somme des absorptions dues aux vibrations ν(N-H) libre de type c_β et d_β et pour A Gly MA celle des bandes c_α et d_α. La superposition pratiquement parfaite des spectres ainsi reconstitués avec les spectres expérimentaux confirme bien le caractère autocohérent de cette méthode de dosage.

233 - DISCUSSION DES RESULTATS

Nos résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau VIII. On constate que les dipeptides possédant une chaîne latérale encombrante (A Ala EA, A Nor MA, A Val EA) ont une tendance plus marquée que les autres (A Gly MA, A Gly EA) à se cycliser sous la forme repliée C_7. Qualitativement, ce phénomène est compatible avec l'évolution générale des contours de basse énergie localisés autour des conformations C_5 et C_7 en fonction de l'encombrement de la chaîne latérale R_1. Signalons que PORTNOVA et coll.(11) ont obtenu de semblables résultats pour les composés du type R-CONH-CH(CH_3)-CONH-CH(CH_3)-$COOCH_3$ en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone en appliquant un procédé d'intégration graphique des absorptions ν(N-H).

Il est intéressant en outre de rapprocher les résultats de ces dosages avec ceux obtenus théoriquement par MAIGRET et coll.(45). En effet, ces auteurs ont cherché à déterminer la probabilité relative des isomères de rotation correspondant à toutes les zones de basse énergie de la carte conformationnelle de A Ala MA en tenant compte d'un terme entropique lié à la forme des puits de potentiel. Dans ces conditions, ils obtiennent environ 14 % de forme étendue (C_5) et 33 % de forme repliée (C_{7ax} + C_{7eq}). Par conséquent, on constate que la proportion des formes étendue et repliée déterminée théoriquement (proche du rapport 2/3) est en bon accord avec nos résultats expérimentaux relatifs aux dipeptides A Ala EA, A Val EA et A Nor MA.

TROISIEME PARTIE

ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES DIPEPTIDES EN SOLUTION AQUEUSE

INTRODUCTION

Jusqu'à présent et à notre connaissance, il n'existe pas d'étude systématique consacrée à l'analyse conformationnelle expérimentale des dipeptides en solution aqueuse, bien que l'eau constitue le milieu d'élection pour les molécules d'intérêt biologique. En fait, à la réflexion, on s'aperçoit que le choix de ce solvant limite fortement le nombre des méthodes physicochimiques utilisables dans de bonnes conditions. Ainsi, pour ne citer qu'un exemple, la spectroscopie infrarouge ne pourra fournir que des informations très fragmentaires sur des solutions pratiquement saturées car les absorptions de H_2O et D_2O sont larges et intenses sur l'ensemble du domaine spectral.

Pour notre part, après avoir soigneusement examiné les avantages et les inconvénients des différentes techniques pouvant contribuer à résoudre notre problème, nous avons choisi d'employer conjointement la spectroscopie Raman et la Diffusion Rayleigh Dépolarisée (D.R.D.). Ces deux techniques présentent a priori le grand avantage de fournir des informations complémentaires analysables en termes de structure. La D.R.D. permet, en effet, de relier dans certaines conditions, l'intensité dépolarisée diffusée par une solution à la conformation de la substance dissoute en interprétant son anisotropie optique moléculaire (γ^2). Par ailleurs, on sait qu'il est possible de mettre en évidence des corrélations entre les fréquences de certaines vibrations et l'environnement des vibrateurs mis en jeu (c'est-à-dire la conformation locale) par l'analyse du spectre Raman. En outre, ces méthodes étant liées toutes deux au phénomène de diffusion de la lumière visible dans un domaine d'intensité comparable, il est possible d'effectuer la mesure D.R.D. et l'enregistrement du spectre Raman sur le même échantillon puisque les conditions opératoires optimales sont quasiment identiques. Cet aspect est d'ores et déjà intéressant à souligner car il permet d'éliminer les difficultés d'interprétation dues à l'utilisation de solvants, de

concentrations et d'appareillage très différents. Il faut signaler enfin que le milieu aqueux se prête bien aux études par diffusion de la lumière car la diffusion intrinsèque de l'eau est très faible.

Dans un premier chapitre, nous exposerons les conditions d'application de la D.R.D. et de la spectroscopie Raman aux systèmes peptidiques en nous référant à une série d'alkylacétamides modèles. Un deuxième chapitre sera consacré à l'étude des dipeptides A Gly MA et A Ala MA en vue de préciser la conformation (ϕ, ψ) du squelette dipeptidique.

GENERALITES ET MISE AU POINT DE LA METHODE

L'objet de ce chapitre est de présenter d'une part les rappels théoriques nécessaires à l'interprétation des informations obtenues par D.R.D. et, d'autre part, les résultats de l'étude préliminaire que nous avons dû effectuer avant de pouvoir entreprendre l'analyse conformationnelle des peptides en solution aqueuse par D.R.D. et spectroscopie Raman.

311 - GENERALITES SUR LA DIFFUSION RAYLEIGH DEPOLARISEE (D.R.D.)

Lorsqu'un faisceau parallèle de lumière monochromatique pénètre dans un milieu constitué de molécules anisotropes, celles-ci diffusent dans tout l'espace une onde lumineuse de même fréquence que l'onde excitatrice. Ce phénomène porte le nom de Diffusion Rayleigh. L'anisotropie optique des molécules se traduit, dans la direction d'observation perpendiculaire au faisceau incident par l'existence d'une composante dépolarisée (i) parallèle à la direction de propagation du faisceau incident. Si l'on assimile les électrons des molécules anisotropes à des oscillateurs de Hertz, on montre que, dans l'approximation du champ de Lorentz, l'intensité dépolarisée diffusée par une solution (i_s) est liée à l'anisotropie optique moléculaire de la substance dissoute par la relation :

$$< \gamma^2 > = \frac{135\ \lambda^4}{16\ \pi^4} \cdot \frac{1}{\mathcal{N}} \cdot \frac{M}{C} \left[i_s \frac{1}{(n^2+2)^2} - i_o \cdot \frac{C_o}{d_o} \frac{1}{(n_o^2+2)^2} \right] \frac{1}{VE^2} \qquad (1)$$

dans laquelle

$< \gamma^2 >$ est l'anisotropie optique moléculaire moyenne* du soluté

λ est la longueur d'onde du faisceau lumineux incident

$\mathcal{N}$: nombre d'Avogadro

---

* dans le cas où la solution contient i isomères de rotation en équilibre

$< \gamma^2 > = \frac{\sum_i n_i \gamma_i^2}{\sum_i n_i}$ n_i étant le nombre de molécules de soluté en conformation i.

M : masse moléculaire du soluté

C : concentration du soluté en $g.cm^{-3}$

n : indice de réfraction de la solution

n_o : indice de réfraction du solvant

i_s : intensité dépolarisée diffusée par la solution

i_o : intensité dépolarisée diffusée par le solvant

C_o : concentration du solvant en $g.cm^{-3}$

d_o : masse volumique du solvant en $g.cm^{-3}$

V : volume diffusant en cm^3

E : amplitude du champ électrique incident.

Dans la pratique, les appareils sont conçus pour mesurer les rapports i_s/i_e et i_o/i_e (58) (i_e étant l'intensité dépolarisée diffusée par un liquide étalon pris dans les mêmes conditions). Par conséquent, la relation (1) devient :

$$< \gamma^2 > = \frac{135\ \lambda^4}{16\ \pi^4} \frac{1}{\mathcal{N}} \frac{M}{C} \left[\frac{i_s}{i_e} \frac{1}{(n^2+2)^2} - \frac{i_o}{i_e} \frac{C_o}{d_o} \frac{1}{(n_o^2+2)^2} \right] \frac{i_e}{VE^2} \qquad (2)$$

Il est alors nécessaire de connaître le rapport $\frac{i_e}{VE^2}$ qui est la constante dépolarisée de Lord Rayleigh (R_e^D) du liquide étalon. La valeur R^D_{cyclo} a été déterminée au laboratoire pour le cyclohexane à partir de celle de la constante totale de Lord Rayleigh du benzène (R^T_Φ) qui est connue avec précision (59) et du facteur de dépolarisation du cyclohexane (60). En effet, on peut connaître la constante R^T_{cyclo} par la mesure du rapport des intensités totales diffusées par deux échantillons identiques de benzène et de cyclohexane car $R^T_{cyclo} = R^T_\Phi . I^T_{cyclo}/I^T_\Phi$. Par ailleurs, les constantes R^T_{cyclo} et R^D_{cyclo} sont liées par la relation :

$$R^D_{cyclo} = \left(\frac{R^T . \rho}{1 + \rho}\right)_{cyclo}$$

Dans les conditions habituelles (T = 25° C, λ = 5460 Å), on a $R^D_{cyclo} = 23,15.10^{-8}$ cm^{-1}. Il faut souligner que la relation (2) permettant d'atteindre l'anisotropie optique moléculaire intrinsèque d'un soluté à partir des mesures de i_s/i_e et i_o/i_e n'est applicable que si la solution est thermodynamiquement idéale au sens de la D.R.D.. Pour cela, on doit s'assurer que son intensité dépolarisée diffusée est une fonction linéaire de la concentration, ce qui entraîne que les interactions de configuration soluté-soluté et soluté-solvant soient négligeables. Dans ces conditions, le principe d'une analyse conformationnelle par D.R.D. consiste

à rechercher une géométrie permettant l'identification de l'anisotropie optique moléculaire expérimentale (γ^2_{exp}) avec celle (γ^2_{calc}) que l'on peut calculer a priori en appliquant la théorie de la valence optique.

D'après cette théorie développée par MEYER et OTTERBEIN (61) et reprise depuis par d'autres auteurs (62, 63, 64), il est possible d'attacher à un groupe d'atomes quelconque un tenseur de polarisabilité optique caractérisant son anisotropie. Les composantes de ce tenseur dépendent évidemment du référentiel choisi pour repérer les atomes du groupe mais il existe toujours un système d'axes rectangulaires dans lequel le tenseur est diagonal. Dans ce cas, le référentiel est dit "principal" et les trois composantes de ce tenseur sont appelés polarisabilités optiques principales. On admet, en outre, que le tenseur de polarisabilité optique d'un groupe d'atomes n'est pas modifié lorsque l'environnement de ce groupe est sensiblement le même. Cette propriété, largement confirmée par l'expérience, justifie en particulier la transférabilité des paramètres optiques déterminés par l'étude de composés modèles à d'autres molécules pour lesquelles le principe de "l'environnement quasi identique" est vérifiée. L'anisotropie optique moléculaire calculée (γ^2_{calc}) est alors obtenue par combinaison tensorielle des paramètres optiques caractéristiques de chaque groupe d'atomes. Ce calcul nécessite la connaissance de leur orientation relative, c'est-à-dire, en fait, celle de la géométrie moléculaire. Il faut rappeler que le paramètre γ^2 est extrêmement sensible à l'orientation des groupes anisotropes de la molécule, c'est-à-dire à la conformation, ce qui permet d'attendre de la méthode une grande précision. De plus, il possède la propriété d'être un invariant tensoriel, et ne dépend donc pas du référentiel moléculaire choisi pour le calcul.

312 - DETERMINATION DES POLARISABILITES OPTIQUES PRINCIPALES DU GROUPEMENT AMIDE O⋯C'⋯N

A) Théorie

Les polarisabilités optiques principales d'un grand nombre de groupes organiques simples ont été déterminées depuis quelques années par BOTHOREL et ses collaborateurs. Cet ensemble de paramètres a déjà été utilisé avec succès pour mener à bien des analyses conformationnelles complexes (62, 65, 66, 67). Ceux que nous utiliserons dans la suite de ce travail sont rassemblés dans le tableau IX. Cependant, pour entreprendre l'étude des systèmes peptidiques, il fallait connaître également les polarisabilités optiques principales du groupe O⋯C'⋯N. Or, ce groupement possède une structure électronique très particulière

ainsi que nous l'avons déjà signalé. Dans ces conditions, il est préférable de le traiter comme une entité plutôt que d'envisager séparément les liaisons C'=O, C'-N et N-H, cette dernière étant en outre connue comme très faiblement anisotrope (69). Nous considèrerons donc toujours le groupe O⩵C'⩵N comme un bloc.

Tableau IX : Polarisabilités optiques principales (α_1, α_2, α_3) et polarisabilité optique moyenne ($\bar{\alpha}$) des groupements considérés dans cette étude.

Liaison ou groupement	α_1 ($\mathring{A}^3$)	α_2 ($\mathring{A}^3$)	α_3 ($\mathring{A}^3$)	$\bar{\alpha}$ ($\mathring{A}^3$)	Réf.
C - H	0,82	0,60	0,60	0,67	(68)
N - H	0,85	0,65	0,65	0,72	(69)
C - C	1,38	0,07	0,07	0,51	(68)
C - N	1,44	0,20	0,20	0,61	(69)
C - CH_3	3,32	2,10	2,10	2,51	(70)
N - CH_3	2,69	1,51	1,51	1,90	(69)
C - $(CH_3)_3$	9,44	7,78	7,78	8,34	(71)
O⩵C'⩵N	4,69	1,99	1,59	2,76	Présent travail

Théoriquement, le tenseur principal de polarisabilité optique du groupe O⩵C'⩵N est entièrement défini si l'on connait d'une part l'orientation du référentiel principal (OXYZ) par rapport aux liaisons C'=O et C'-N et d'autre part les valeurs des trois polarisabilités (α_{xx} suivant OX, α_{yy} suivant OY, α_{zz} suivant OZ). Le motif peptidique étant plan, un des axes principaux (OZ) est nécessairement perpendiculaire à ce plan. La position du trièdre principal est alors parfaitement fixée par l'angle θ entre la liaison C'-N et l'un des axes du trièdre (OX par exemple) (fig. 22).

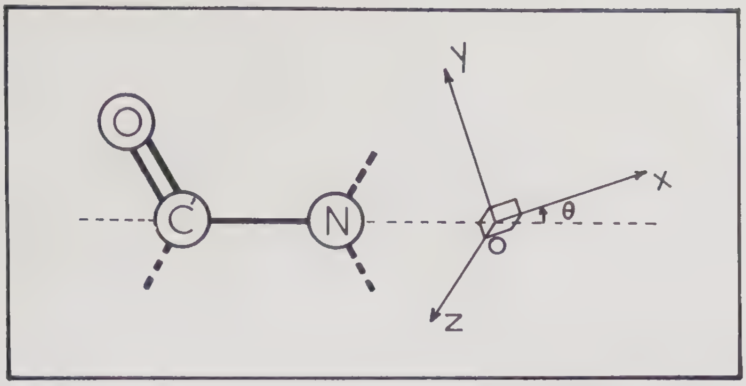


Fig. 22 : Orientation du trièdre principal de polarisabilité du groupe O C' N par rapport au plan O C' N. (OX, OY dans le plan, OZ perpendiculaire au plan).

Le problème se ramène donc à la détermination de 4 inconnues α_{xx}, α_{yy}, α_{zz} et θ ; les trois premières ne sont pas indépendantes car elles satisfont à la relation :

$$\bar{\alpha}_{(OC'N)} = \frac{\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}}{3}$$

$\bar{\alpha}_{(OC'N)}$ étant la polarisabilité optique moyenne du groupement O⩦C'⩦N.

Deux types d'informations vont nous permettre d'obtenir le nombre d'équations indépendantes nécessaires et suffisantes pour la détermination univoque de ces quatre inconnues : on peut montrer en effet que l'anisotropie optique moléculaire d'un composé de formule générale $R-(OC'N)-R_1R_2$ (I) ne comportant que le groupement O⩦C'⩦N comme inconnue peut se mettre sous la forme d'un polynôme du second degré en X et Y avec $X = \alpha_{xx} - \alpha_{yy}$; $Y = \alpha_{yy} - \alpha_{zz}$; $-(X + Y) = \alpha_{zz} - \alpha_{xx}$ dans lequel interviennent également les facteurs U et V ($U = 1 + \cos 2\theta$; $V = 1 - \cos 2\theta$). Par ailleurs, la polarisabilité optique moyenne déduite de la réfraction molaire d'un composé (I) est un polynôme du premier degré en $\bar{\alpha}_{OC'N}$.

Nous avons donc entrepris l'étude d'une série de quatre composés (I) pour qu'il soit possible, avec l'un quelconque d'entre eux, de vérifier la validité du système de paramètres déterminé à l'aide des trois autres.

B) Choix des molécules modèles et interprétation des résultats expérimentaux.

Pour lever toute ambiguité due à une éventuelle isomérie de rotation des radicaux R, R_1 et R_2, nous avons sélectionné trois types de substituants déjà bien connus en D.R.D. et présentant une symétrie de révolution : - H, - CH_3, - $C(CH_3)_3$. Compte tenu de ce choix, on dispose de deux séries possibles de molécules modèles : les formamides et les acétamides. Les formamides ne sont pas adaptés à l'étude du motif O⋯C'⋯N peptidique par suite de la présence de la fonction aldéhyde qui en perturbe la structure électronique. Les acétamides, et particulièrement le N-méthylacétamide (NMA) sont les plus représentatifs comme en témoignent les différents travaux dont ils ont fait l'objet (47, 72 à 78). Il a été montré en particulier que le pourcentage de forme "cis" des N-alkylacétamides monosubstitués est négligeable (79). Nous considèrerons donc par la suite que le motif C'ONH est exclusivement en conformation "trans".

Tableau X : Valeurs expérimentales de l'anisotropie optique moléculaire (γ^2), de la réfraction molaire (R_M) et de la polarisabilité optique moyenne du groupe O⋯C'⋯N ($\bar{\alpha}_{OC'N}$) pour quelques N-alkylacétamides.

COMPOSES	γ^2 (Å^6)	R_M (cm^3)	$\bar{\alpha}_{OC'N}$ (Å^3)
Acétamide	11,2		
N-méthylacétamide	14,4	19,90	2,76
N,N-diméthylacétamide	21,1		
N-tertiobutylacétamide	17,3		
N-éthylacétamide	16,7	24,46	2,73

Nos résultats expérimentaux rassemblés dans le tableau X et interprétés à l'aide d'une méthode graphique d'intersection d'ellipses conduisent aux valeurs suivantes :

$$\theta = 30^\circ \pm 3^\circ$$
$$\alpha_{xx} - \alpha_{yy} = -2,70 \pm 0,05 \text{ Å}^3$$
$$\alpha_{yy} - \alpha_{zz} = 3,10 \pm 0,05 \text{ Å}^3$$

Compte tenu de la valeur $\overline{\alpha}_{OC'N} = 2{,}76 \ \mathring{A}^3$ tirée de l'étude de la réfraction molaire au N-méthylacétamide, on obtient :

$$\alpha_{xx} = 1{,}99 \pm 0{,}05 \ \mathring{A}^3$$
$$\alpha_{yy} = 4{,}69 \pm 0{,}05 \ \mathring{A}^3$$
$$\alpha_{zz} = 1{,}59 \pm 0{,}05 \ \mathring{A}^3$$

On constate par ailleurs que l'un des axes principaux de polarisabilité du plan O$\stackrel{...}{-}$C'$\stackrel{...}{-}$N (OY) se trouve pratiquement confondu avec la liaison C' = O ; en conséquence, nous désignerons par α_1 (4,69 $\mathring{A}^3$) la polarisabilité optique principale correspondante, les deux autres situées respectivement dans le plan et hors du plan seront notées α_2 (1,99 $\mathring{A}^3$) et α_3 (1,59 $\mathring{A}^3$).

Nous avons vérifié la validité de ce système de paramètres en calculant l'anisotropie optique moléculaire du N-tertiobutylacétamide ; la valeur calculée $\gamma^2_{calc} = 17{,}1 \ \mathring{A}^6$ est en parfait accord avec la valeur expérimentale $\gamma^2_{exp} = 17{,}3 \ \mathring{A}^6$ (moins de 2 % d'erreur).

313 - <u>ETUDE DE LA CONFORMATION DU GROUPE ETHYLE DANS LE N-ETHYLACETAMIDE EN SOLUTION AQUEUSE</u>.

Pour tester l'ensemble de la méthode sur une molécule relativement simple et connaître la conformation que présente en solution aqueuse un substituant éthyle situé en "aval" du plan peptidique, le N-éthylacétamide (NEA) est un bon modèle. Conformément à notre méthode d'étude, nous avons tout d'abord comparé les spectres Raman des NMA et NEA hydrogénés et N-deutériés, dissous respectivement dans H_2O et D_2O. Cette analyse est en effet susceptible de nous indiquer si NEA présente en solution un ou plusieurs isomères de rotation. En outre, l'examen des absorptions caractéristiques des groupements C'ONH de NMA et NEA doit permettre, au même titre que leur réfraction molaire, de vérifier s'il est possible de transférer les polarisabilités optiques du groupe O$\stackrel{...}{-}$C'$\stackrel{...}{-}$N de NMA à NEA.

A) <u>Analyse des spectres Raman</u>

Les spectres Raman de NMA et NEA en solution dans H_2O et D_2O entre 1800 et 200 cm^{-1} sont représentés respectivement sur les figures 23 et 24. L'interprétation que nous proposons a été rassemblée dans le tableau XI. Elle ne sera pas discutée en détail ici, car elle est proche de celle proposée par JAKES et KRIMM (78) pour l'état liquide pur. Cependant, la comparaison des intensités relatives

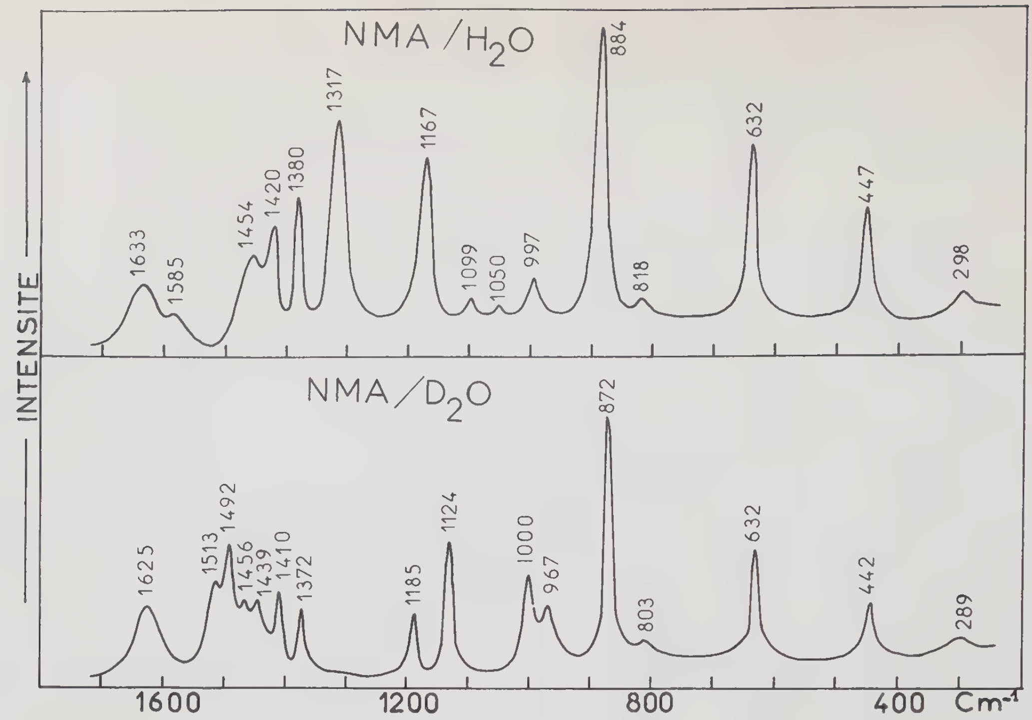


Fig. 23 : Spectres Raman de 1800 à 200 cm^{-1} des N-méthylacétamides N-hydrogéné et N-deutérié en solution dans H_2O et D_2O. (C ≃ 2 moles/litre ; T = 25°C).

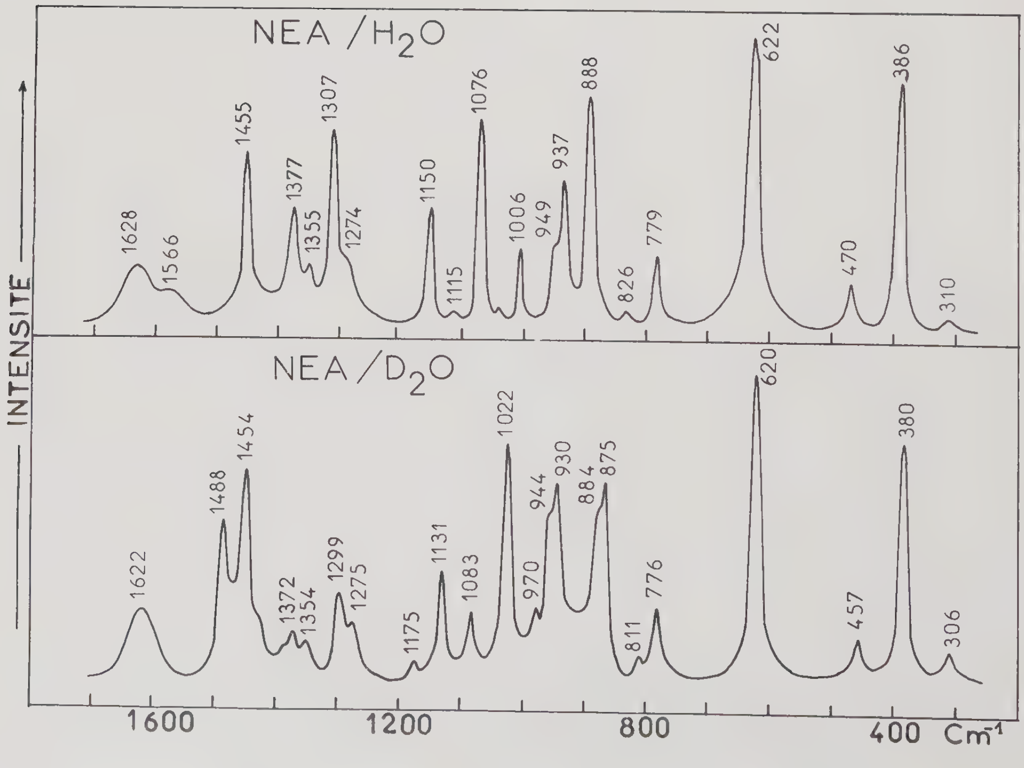


Fig. 24 : Spectres Raman de 1800 à 200 cm^{-1} des N-éthylacétamides N-hydrogéné et N-deutérié en solution dans H_2O et D_2O.

Tableau XI : Attribution des spectres Raman des NMA et NEA en solution dans H_2O et D_2O entre 1800 et 200 cm^{-1}.

NMA(H)/H_2O	NMA(D)/D_2O	Attribution	NEA(H)/H_2O	NEA(D)/D_2O	Attribution
1633	1625	Amide I	1628	1622	Amide I
1585		Amide II	1566		Amide II
	1513 P				
	1492 P	Amide II'		1488 P	Amide II'
1454	1456	$\delta_d CH_3$(C')	1455	1454	δCH_3
	1439			1432	δCH_2
1420	1410	$\delta_s CH_3$(N)			
				1380	
1380 P	1372	$\delta_s CH_3$(C')	1377 P	1372	$\delta_s CH_3$
			1355	1354	WCH_2
1317 P		Amide III	1307 P		Amide III
				1299	
			1274	1275	tCH_2
				1175	
1167 P	1185	rCH_3(N)	1150 P	1131 P	νC-N
	1124 P	νC-N			
			1115		
1099		$r_{\perp} CH_3$(N)			
			1076 P	1083 P	$r_{//} CH_3$(Ethyl)
1050		$r_{\perp} CH_3$(C')	1043		$r_{\perp} CH_3$(C')
997 P	1000 P	$r_{//} CH_3$(C')	1006 P	1022 P	$r_{//} CH_3$(C')
	967	Amide III'		970	Amide III'
			949	944	$r_{\perp} CH_3$(Ethyl)
			937 P	930 P	νC-C(Ethyl)
				884	
884 P	872	νC - C'	888 P	875	νC - C'
818	803		826	811	
			779 P	776 P	rCH_2
632 P	632 P	Amide IV	622 P	620 P	Amide IV
447 P	442 P	δCC'N	470	457	δNCC
			386 P	380 P	δCC'N
298	289	δC'NC	310	306	δC'NC

des bandes infrarouges et Raman ainsi que l'examen de la polarisation des raies Raman nous ont permis d'apporter quelques précisions concernant en particulier les mouvements du squelette de ces composés en solution aqueuse. Ainsi, nous attribuons la bande vers 1167 cm^{-1} dans NMA à la superposition des vibrations ν(C-N) et $r_{/\!/}CH_3$(N). On observe en effet deux absorptions dans cette région pour NMA N-deutérié (1185 cm^{-1} : $r_{/\!/}CH_3$(N) et 1124 cm^{-1} : ν(C-N) alors que NEA n'en présente qu'une (1150 cm^{-1} : ν(C-N) qui subit un glissement de fréquence comparable par N-deutériation (1131 cm^{-1}). Il a été possible par ailleurs de situer les vibrations de déformation du squelette entre 500 et 200 cm^{-1}, bien qu'un récent calcul de modes normaux (80) ait montré que ces mouvements sont fortement couplés.

On peut constater dès à présent que l'interprétation des spectres confirme l'hypothèse de l'existence d'un seul isomère de rotation pour NEA en solution aqueuse : les spectres du NEA se déduisent très logiquement de ceux du NMA et ne présentent aucun dédoublement de bandes caractéristiques d'un équilibre conformationnel.

Si l'on compare maintenant les absorptions du groupement amide, on constate que les fréquences des bandes homologues sont légèrement plus basses pour NEA que pour NMA (tableau XI). Les causes de ce phénomène sont complexes à analyser et surtout à distinguer. Nous admettons quant à nous que ces écarts ne sont pas significatifs d'une perturbation électronique appréciable du groupement C'ONH. Les résultats obtenus par réfraction molaire confirment cette idée car les polarisabilités optiques moyennes du groupement O$\cdots$C'$\cdots$N déduites de l'expérience sont en très bon accord ($\bar{\alpha}_{OC'N}$ = 2,76 $\mathring{A}^3$ pour NMA et $\bar{\alpha}_{OC'N}$ = 2,73 $\mathring{A}^3$ pour NEA).

B) <u>Détermination de l'angle azimutal (Φ) par D.R.D. et discussion des résultats</u>.

La conformation du N-éthylacétamide est définie lorsqu'on connait l'angle Φ caractérisant la rotation du radical méthyle autour de la liaison (H)N-C(H_2) (fig. 25).

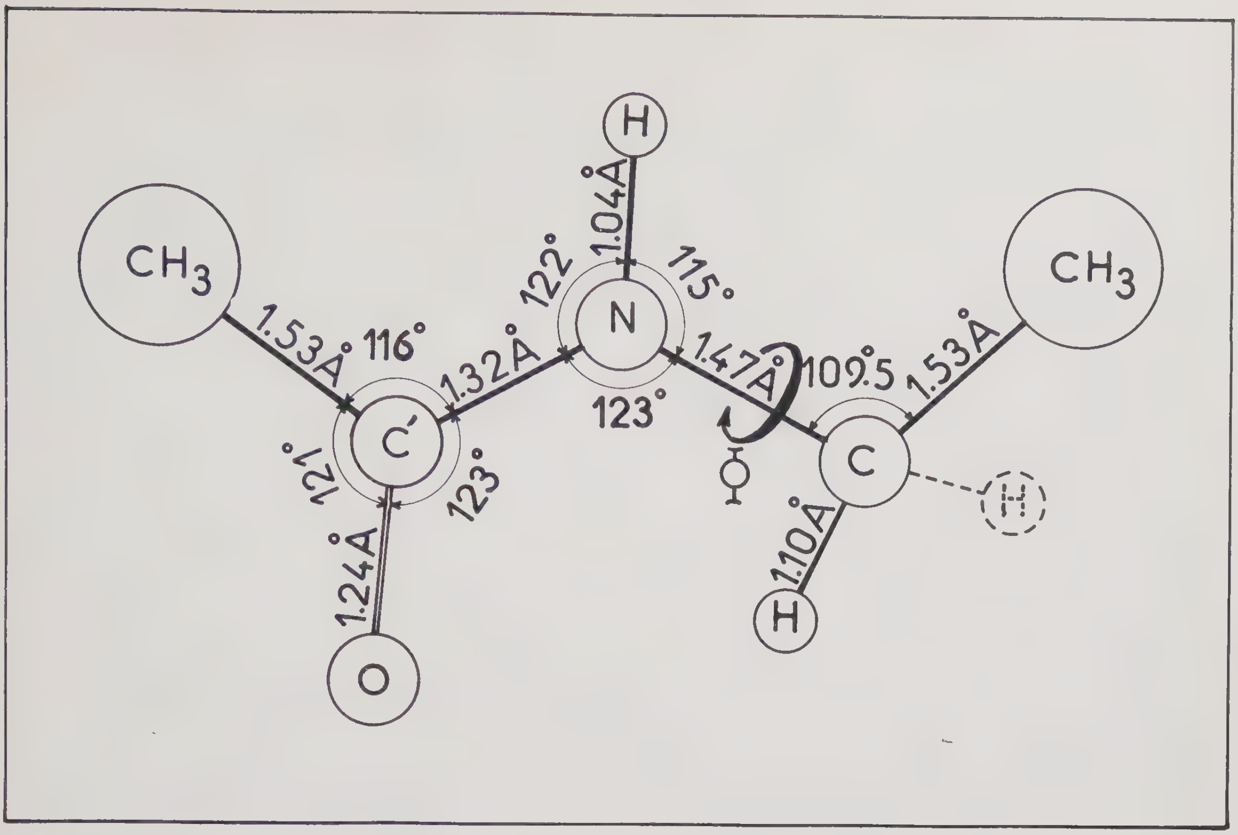


Fig. 25 : Paramètres géométriques du N-éthylacétamide.

Par conséquent, nous avons recherché s'il existait un ou plusieurs angles Φ conduisant à une valeur de l'anisotropie optique moléculaire théorique compatible avec celle déterminée expérimentalement compte tenu de l'incertitude des mesures (± 3 %). Dans ce but, nous avons conçu spécialement un programme de calcul tensoriel (ANISO) pour interpréter nos résultats en termes d'isomérie de rotation. A partir des polarisabilités optiques de liaison et d'une géométrie de départ, le programme ANISO permet de calculer les anisotropies optiques moléculaires des conformations obtenues en faisant varier les valeurs de tous les angles azimutaux qui définissent les rotations internes possibles.

Dans le cas du N-éthylacétamide, nous avons incrémenté l'angle Φ de 10° en 10° entre 0 et 360°. Les paramètres géométriques utilisés proviennent des

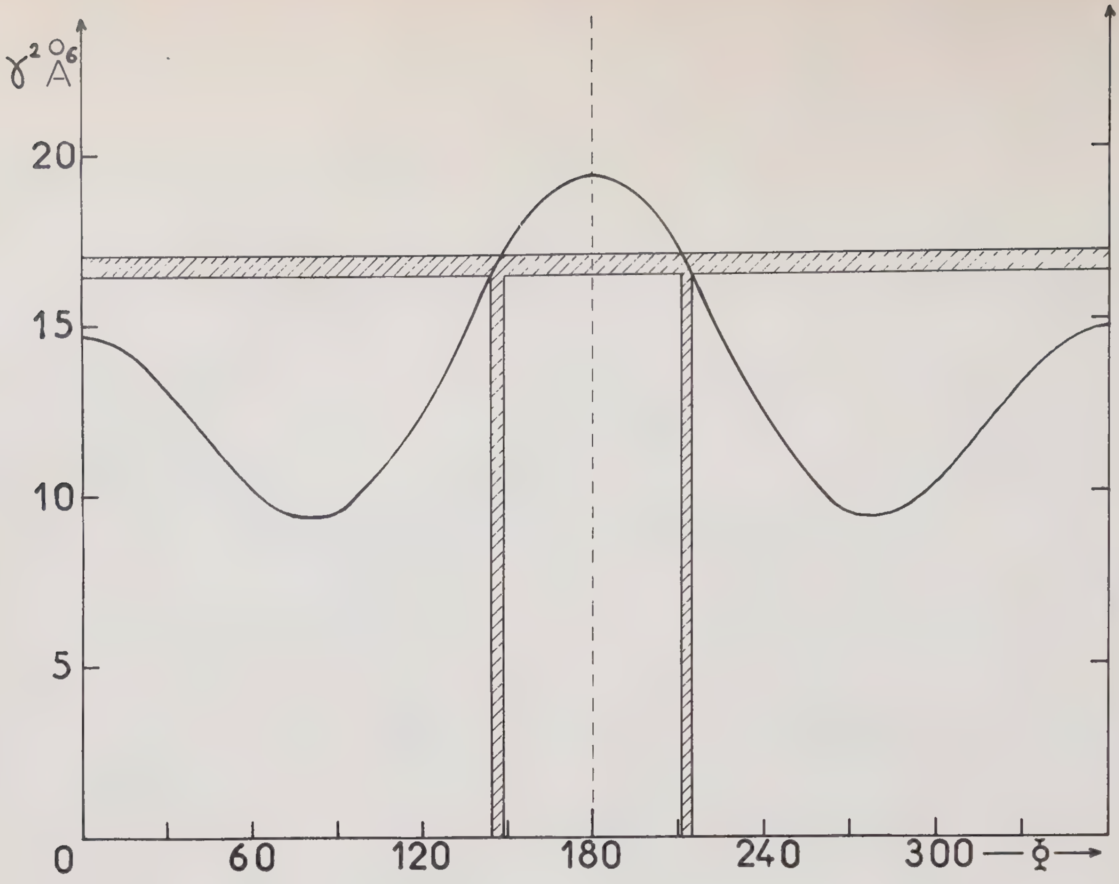


Fig. 26 : Variation de l'anisotropie optique moléculaire (γ^2) du N-éthylacétamide en fonction de l'angle Φ.

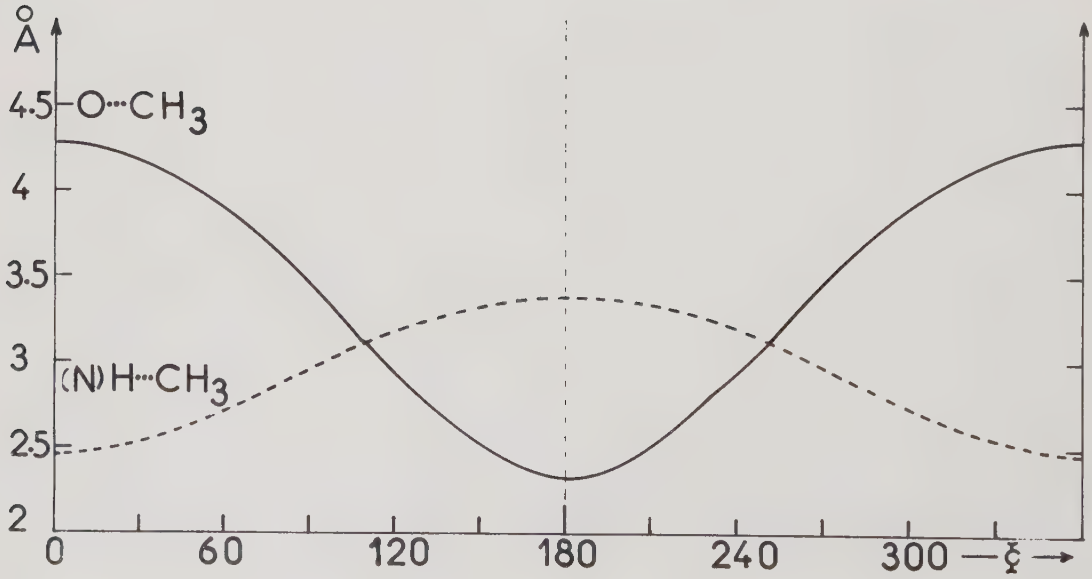


Fig. 27 : Variation des distances O....C(H_3) et (N)H....C(H_3) du N-éthylacétamide en fonction de l'angle Φ.

compilations de SCOTT et SCHERAGA (19) et de POPOV et coll (22) : ils sont rassemblés sur la figure 25. Les polarisabilités optiques principales des groupes anisotropes constituant la molécule sont celles du tableau IX. La conformation origine ($\Phi = 0$) est telle que la liaison $(H_2)C-C(H_3)$ éclipse la liaison N-H. Les résultats de ce calcul permettent de tracer le graphe (fig. 26) de la variation de l'anisotropie optique moléculaire (γ^2_{calc}) en fonction de la conformation (Φ). Compte tenu de la précision avec laquelle a été déterminée la valeur expérimentale de γ^2 (zone hachurée fig. 26), nous adoptons pour Φ la valeur 146° ± 3° (ou 214° ± 3° qui correspond à la même conformation).

Il semble donc que dans l'eau les deux groupements encombrants C'=O et CH_3 sont en position d'interaction maximale puisque la distance $O...C(H_3)$ est comprise entre 2,5 et 2,6 Å (fig. 27), c'est-à-dire légèrement inférieure aux valeurs correspondantes relevées par SCHERAGA et coll (17).

Ce résultat est à rapprocher de celui que proposent ROMERS et coll (81) pour la structure de la diéthylcétone à l'état vapeur par diffraction électronique. D'après ces auteurs, on obtient une disposition analogue des groupements méthyle et carbonyle (la liaison $(H_2)C-C(H_3)$ éclipse la liaison C=O) conduisant à une distance $(C)O...C(H_3)$ égale à 2,67 Å. Il faut aussi remarquer que la conformation que nous proposons pour NEA en solution aqueuse diffère notablement de celle que l'on observe dans un solvant inerte comme le tétrachlorure de carbone (82). Notons enfin que le "repliement" du CH_3 sur le C'=O conduisant à placer ces deux groupements en interaction forte constitue vraisemblablement un des facteurs pouvant expliquer l'abaissement de fréquence observé entre les bandes "amide" de NMA et NEA.

L'ensemble de ces résultats montre que l'on dispose là d'une méthode précise d'investigation des conformations moléculaires en milieu aqueux. On constate en particulier que les valeurs des angles de rotation interne déduites de l'interprétation de l'anisotropie optique moléculaire se rangent dans un domaine très étroit (146 ± 3°) dans le cas de l'angle Φ du N-éthylacétamide).

DETERMINATION DES ANGLES ϕ ET ψ DE A Gly MA et A Ala MA : CONFORMATION DU SQUELETTE DIPEPTIDIQUE

La méthode que nous allons appliquer pour analyser la conformation des dipeptides dérivés de la glycine et de l'alanine en solution aqueuse découle de celle déjà utilisée dans le cas du N-éthylacétamide. L'attribution du spectre Raman préalable à l'analyse D.R.D. est toujours indispensable pour établir l'existence d'un ou plusieurs isomères de rotation dans la solution. Toutefois, pour discuter du caractère transférable des polarisabilités optiques du groupement O⋯C⋯N des alkylacétamides aux dipeptides, il s'est avéré nécessaire d'effectuer, en outre, une étude comparative de leur réfraction molaire.

Par contre, en ce qui concerne l'interprétation de l'anisotropie optique moléculaire d'un dipeptide en termes de conformation, nous avons été conduit à modifier quelque peu la méthode décrite au cours du chapitre précédent. En effet, son application littérale amenait à une indétermination mathématique car on ne dispose que d'une information expérimentale (γ^2 exp) pour déduire les valeurs des deux angles azimutaux ϕ et ψ.

C'est pourquoi, nous avons introduit un procédé de "perturbation d'anisotropie" fondé sur l'étude comparative des dipeptides N-méthylés et N-éthylés. Nous allons maintenant analyser le détail de ces différents points avant d'entreprendre la discussion de nos résultats expérimentaux.

321 - INTERPRETATION DES SPECTRES RAMAN DES DIPEPTIDES

Les spectres Raman des dipeptides A Gly MA, A Gly EA, A Ala MA et A Ala EA en solution dans H_2O ainsi que ceux de leurs homologues N-deutériés dissous dans D_2O sont représentés sur les figures 28 et 29. La figure 30 regroupe les spectres infrarouges et Raman de A Gly MA et A Gly MA N-deutériés à l'état solide. Elle nous a permis de comparer les intensités relatives et les fréquences des absorptions infrarouges et des raies Raman homologues. Les attributions que nous

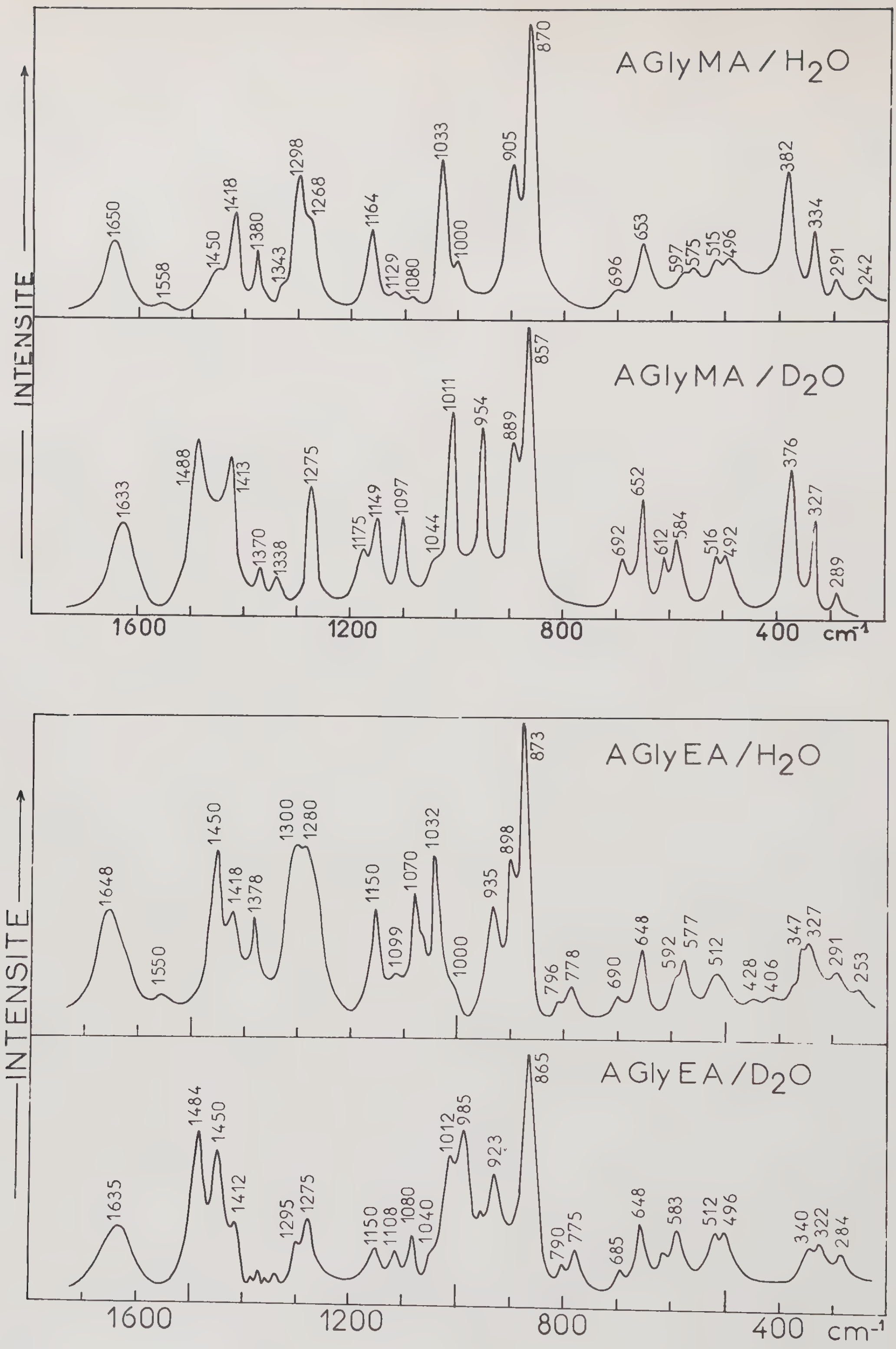


Fig. 26 : Spectres Raman de 1800 à 200 cm^{-1} de A Gly MA et A Gly EA et de leurs homologues N-deutériés en solution dans H_2O et D_2O. (C ≈ 2 moles/litre ; T = 25°C).

Tableau XII : Attribution des spectres Raman de A Gly MA, A Gly EA, A Ala MA et A Ala EA hydrogénés en solution dans H_2O entre 1800 et 200 cm^{-1}.

AGly MA	AGly EA	ATTRIBUTIONS	A Ala MA	A Ala EA	ATTRIBUTIONS
1650	1648	Amide I	1650	1645	Amide I
1558	1550	Amide II	1552	1550	Amide II
1450	1450	$\delta_d(CH_3)$ C'	1458	1455	$\delta_d(CH_3)$ C'
			1420		$\delta_s(CH_3)$ N
1418	1418	$\delta(C\alpha H_2)$, $\delta_s(CH_3)$ N	1381	1380	$\delta_s(CH_3)$ C' + Amide III a
1380	1378	$\delta_s(CH_3)$C' + Amide III a	1324 ep	1324 ep	$\delta_s(CH_3)$ C' + Amide III a
			1296	1304 ep	δ(C - H)
1343		$W(CH_2)$	1272 ep	1286	Amide III b
				1266 ep	tw (CH_2) éthyl
1298	1300	$\delta_s(CH_3)$ + Amide III a			
1268	1280	Amide III b, tw CH_2			
1164		$r(CH_3)$ N		1182	
			1164		$r(CH_3N)$
1129	1150	ν(C - N)		1151	ν(C - N)
	1099	$r(CH_3)$ éthyl			
1080		$r(CH_3)$ N	1107	1106	$\nu(C_\alpha - N)$
	1070	$r(CH_3)$ éthyl		1080	$r(CH_3)$ éthyl
1033	1032	$\nu_a(C'-C_\alpha-N)$		1052	
1000	1000	$r(CH_3)C'$	1036		$r(CH_3)$ C
			1003	1010	$r(CH_3)$ C'
	935	ν(C-C) éthyl			
			960	967	
905	898	ν(C-C') $r(CH_2)$			ν(C-C)
870	873	$\nu_s(C'-C_\alpha-N)$	922	928	ν(C-C) éthyl
	796			900 ep	ν(C-C')
	778	$r(CH_2)$ éthyl	864	888	
696	690	Amide IV b		785	$r(CH_2)$ éthyl
653	648	Amide IV a	760	755	Harmonique
			702		Amide IV b
597	592	Amide VI a	644	640	Amide IV a
575	577	Amide VI b			
			538	537	
515	512	Déformations	520	523	
496		du squelette			
	428			450	Déformations
					du squelette
	406		395	388	
382			372		
	347		348	332	
334	327	Torsions			Torsions
		du squelette	278		du squelette
291	291				
242	253				

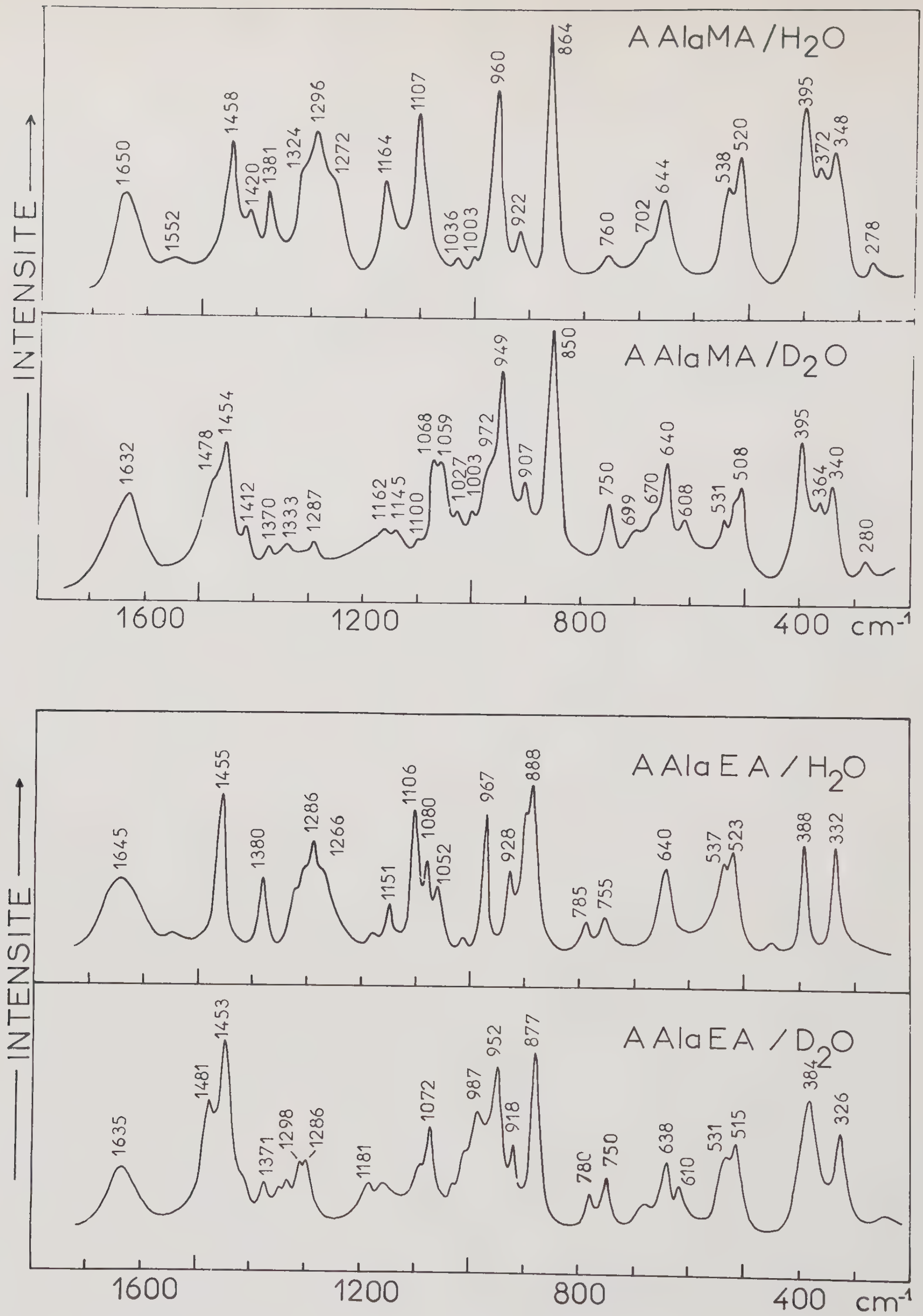


Fig. 29 : Spectres Raman de 1800 à 200 cm^{-1} de A Ala MA et A Ala EA et de leurs homologues N-deutériés en solution dans H_2O et D_2O. (C ≈ 2 moles/litre ; T = 25°C).

Tableau XIII - Attribution des spectres Raman de A Gly MA, A Gly EA, A Ala MA et A Ala EA N-deutériés en solution dans D_2O entre 1800 et 200 cm^{-1}.

A Gly MA (D)	A Gly EA (D)	ATTRIBUTIONS
1633	1635	Amide I
1488	1484	Amide II'
	1450	
1413	1412	$\delta_s(CH_3)N$, $\delta(CH_2)$
	1380	
1370	1370	$\delta_s(CH_3)C'$
	1354	W CH_2
1338	1338	
	1295	tw CH_2
1275	1275	
1175		$r(CH_3)$ N
1149	1150	$\nu(C-N)$
	1108	$r(CH_3)$ éthyl
	1080	
1097		$r(CH_3)$ N
1044 ep	1040	$r(CH_3)$ C'
1011	1012	$\nu_a(C'-C-N)$
	985	Amide III'
954	954	
	923	$\nu(C-C)$ éthyl
889	881 ep	$\nu(C-C')$
857	865	$r(CH_2)$
		$\nu_s(C'-C_\alpha-N)$
	790	
	775	$r(CH_2)$ éthyl
692	685	Amide IV b
652	648	Amide IV a
612	610	Amide VI a
584	583	Amide VI b
516	512	Déformation
492	496	du squelette
376	340	
327	322	
		Torsions du
289	284	squelette

A Ala MA (D)	A Ala EA (D)	ATTRIBUTIONS
1632	1635	Amide I
1478	1481	Amide II'
1454	1453	$\delta_d(CH_3)$ C'
	1422	$\delta(CH_2)$
1412		$\delta_s(CH_3)$ N
1370	1371	$\delta_s(CH_3)$ C
	1353	WCH_2 éthyl
1333	1335	$\delta(CH)$
	1298	tw CH_2 éthyl
1287	1286	$\gamma(CH)$
	1181	
1162		$r(CH_3)$ N
1145	1158	$\nu(C-N)$
1100		$r(CH_3)$ N
	1095 ep	$r(CH_3)$ éthyl
1068	1072	$\nu(C_\alpha-N)$
1059		
1027	1028 ep	$r(CH_3)$
1003	1010 ep	
972	987	Amide III'
949	952	$\nu(C - C)$
	918	$\nu(C-C)$ éthyl
907		
850	877	$\nu(C-C')$
	780	$r(CH_2)$ éthyl
750	750	Harmonique
699	696	Amide IV b
670		
640	638	Amide IV a
608	610	Amide VI a
531	531	
508	515	
		Déformation
395	384	du squelette
364		
340	326	
		Torsions du
280		squelette

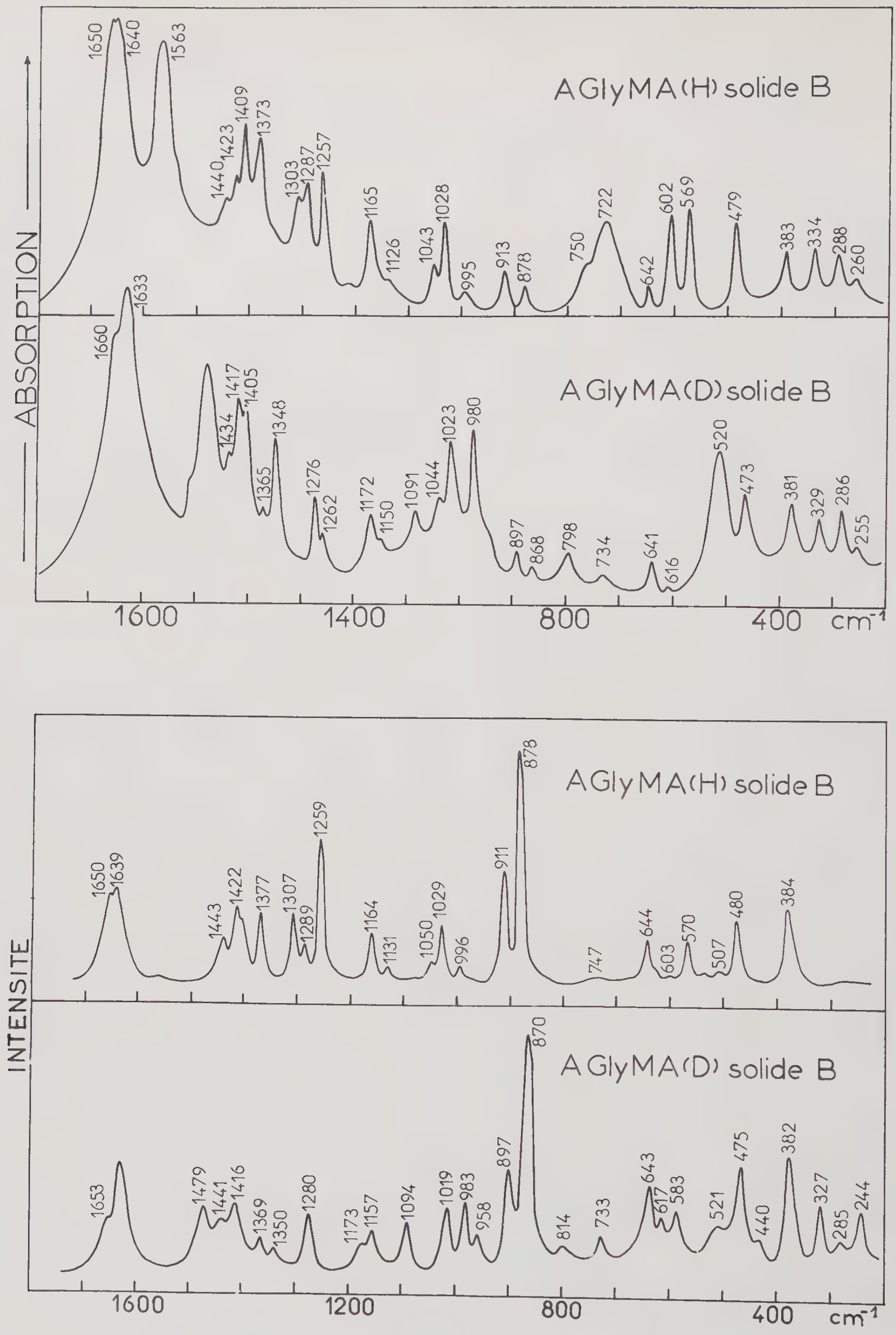


Fig. 30 : Spectres infrarouges et Raman de 1800 à 200 cm^{-1} de A Gly MA et de A Gly MA N-deutérié à l'état solide, forme B.

proposons pour les spectres Raman de A Gly MA, A Gly EA, A Ala MA et A Ala EA hydrogénés et N-deutériés en solution aqueuse sont rassemblés sur les tableaux XII et XIII ; notre interprétation a été largement inspirée des résultats de nos précédents travaux (83, 84) ainsi que de ceux de JAKES et KRIMM (78), SHIMANOUCHI et coll.(85, 86), THEORET et coll.(57), et KOENIG et coll.(87, 88). Il nous paraît inutile d'en effectuer l'analyse détaillée, d'autant plus que nous serons amené à le faire pour les régions spectrales interprétables en termes de conformation lors de la discussion de nos résultats D.R.D.. Cependant, l'attribution de ces spectres permet de montrer d'ores et déjà que les dipeptides adoptent, en solution dans l'eau, une seule conformation. En effet, nous n'avons pas relevé d'absorptions dédoublées caractéristiques de la coexistence de deux isomères de rotation comme cela a été observé pour A Gly MA et A Ala MA à l'état solide (85, 86), en solution dans le tétrachlorure de carbone et en matrice d'argon.

En ce qui concerne les informations que l'on peut tirer de cette analyse en vue de justifier du transfert des paramètres optiques du groupe O⩦C'⩦N des alkylacétamides aux dipeptides, il convient d'être très réservé. La comparaison directe des fréquences des absorptions amides homologues est délicate car les vibrations correspondantes sont soit couplées avec les mouvements de squelette (amide III, IV, VI et VII) soit fortement sensibles à la conformation et aux phénomènes de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires (Amide I, II et V). On peut signaler cependant que ces absorptions se retrouvent à des fréquences proches. Pour notre part, nous avons estimé que ce critère était insuffisant pour établir le caractère transférable des paramètres optiques du groupement O⩦C'⩦N des alkylacétamides aux dipeptides. C'est pourquoi, nous avons entrepris une étude comparative de leurs réfractions molaires.

322 - ETUDE COMPARATIVE DE LA REFRACTION MOLAIRE DES ALKYLACETAMIDES ET DES DIPEPTIDES.

A l'état liquide pur, la réfraction molaire d'un composé est de la forme :

$$R_M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \frac{M}{d}$$

dans laquelle n est l'indice de réfraction du liquide, d sa masse volumique et M sa masse moléculaire. En solution diluée, les résultats de SMITH (89) et SMYTH (90) ont permis de montrer que la réfraction molaire de la solution est une fonction linéaire de la fraction molaire du soluté et obéit aux relations

$$R_{M_{solution}} = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \; \frac{x_1 M_1 + x_o M_o}{d} = (R_{M_1} - R_{M_o})\, x_1 + R_{M_o}$$

dans lesquelles n est l'indice de réfraction de la solution, d sa masse volumique ; x_1 et x_o sont respectivement les fractions molaires du soluté et du solvant, M_1 et M_o leur masse molaire, R_{M_1} la réfraction molaire intrinsèque du soluté et R_{M_o} celle du solvant à l'état liquide pur. De plus, il est possible de relier la réfraction molaire d'une substance à sa polarisabilité optique moléculaire moyenne $(\overline{\alpha})$, car

$$R_M = \frac{4}{3} \pi \mathcal{N} \overline{\alpha} \qquad (\mathcal{N} : \text{nombre d'AVOGADRO})$$

Enfin, de multiples travaux expérimentaux ont établi que les polarisabilités optiques des liaisons sont non seulement additives, mais aussi indépendantes de la nature du solvant et de la géométrie moléculaire (91 à 96). Par contre, elles varient de façon significative suivant l'état électronique de la liaison considérée. Nous avons donc déterminé $\overline{\alpha}_{OC'N}$ à partir de la réfraction molaire des dipeptides A Ala MA et A Ala EA en utilisant les valeurs des polarisabilités optiques moyennes de liaison du tableau IX. Le bon accord entre ces résultats et ceux déjà obtenus dans le cas des alkylacétamides (tableau XIV) justifie notre hypothèse selon laquelle les paramètres optiques du groupe O⩦C'⩦N des alkylacétamides sont transférables aux dipeptides. Par conséquent, nous disposons maintenant d'un jeu de paramètres nous permettant d'aborder l'analyse conformationnelle des dipeptides en solution aqueuse par D.R.D..

Tableau XIV : Réfraction molaire et polarisabilités optiques moyennes de quelques N-alkylacétamides et dipeptides.

COMPOSE	FORMULE	R_M cm^3	$\overline{\alpha}_M$ $\mathring{A}^3$	$\overline{\alpha}_{OC'N}$ $\mathring{A}^3$
NMA	CH_3-CONH-CH_3	19,90	7,89	2,76
NEA	CH_3-CONH-C_2H_5	24,46	9,70	2,73
A Ala MA	CH_3-CONH-CH(CH_3)-CONH-CH_3	37,29*	14,79	2,88
A Ala EA	CH_3-CONH-CH(CH_3)-CONH-C_2H_5	41,92*	16,62	2,88

* Valeur moyenne sur trois solutions de concentrations différentes

323 - METHODE DE PERTURBATION D'ANISOTROPIE

Ainsi que nous l'avons déjà noté, l'interprétation de l'anisotropie optique moléculaire d'un dipeptide conduit nécessairement à une indétermination car il n'est pas possible de calculer les valeurs des deux angles azimutaux ϕ et ψ à partir d'une seule information expérimentale (γ^2 exp). La méthode de perturbation d'anisotropie a été mise au point pour permettre de lever partiellement cette indétermination. Elle se fonde essentiellement sur deux hypothèses. En premier lieu, on peut penser que la conformation globale (ϕ, ψ) d'un dipeptide ne dépend pas de la nature des groupements terminaux R_2 lorsque ceux-ci sont peu différents. Par conséquent, nous admettrons que les squelettes des dipeptides N-méthylés et N-éthylés adoptent la même conformation ($\phi_{MA} = \phi_{EA}$; $\psi_{MA} = \psi_{EA}$). Cette hypothèse nous a été suggérée par la grande similitude des spectres Raman de A Gly MA et A Gly EA d'une part et de A Ala MA et A Ala EA d'autre part sur l'ensemble du domaine spectral. Elle nous parait d'autant plus justifiée que nous n'avons jamais constaté, jusqu'à présent, de modification notable dans la conformation du squelette - tant à l'état solide qu'en solution dans le tétrachlorure de carbone ou en matrice - en substituant le groupe méthyle de bout de chaîne par le groupe éthyle.

Nous admettrons en second lieu que la conformation de la séquence terminale - $CONH-CH_2-CH_3$ des dipeptides N-éthylés (A Gly EA et A Ala EA) est semblable à celle que nous avons déterminée expérimentalement dans le cas du N-éthylacétamide en solution aqueuse.

Ainsi, parmi les isomères pour lesquels l'anisotropie optique moléculaire calculée égale la grandeur expérimentale, la méthode permet de sélectionner, compte tenu des hypothèses précédentes, ceux qui vérifient simultanément les relations $\phi_{MA} = \phi_{EA}$ et $\psi_{MA} = \psi_{EA}$.

Cette méthode est généralisable à des séries de molécules pour lesquelles une faible perturbation de bout de chaîne n'affecte par la conformation moléculaire globale. En effet, si l'on dispose d'un nombre suffisant de tels composés modèles, il est possible d'obtenir les informations expérimentales (γ^2 exp) nécessaires à la détermination univoque des paramètres conformationnels.

324 - APPLICATION DE LA METHODE

Les anisotropies optiques moléculaires expérimentales des dipeptides sont rassemblées dans le tableau XV. Dans chaque cas, nous avons étudié au minimum quatre solutions de concentration différente afin d'évaluer l'ordre de grandeur des incertitudes (environ 3 %) et de vérifier la linéarité de la fonction $i/i_o = f(c)$.

Tableau XV : Anisotropies optiques moléculaires expérimentales des dipeptides en solution aqueuse.

COMPOSE	FORMULE	γ^2_{exp} Å^6
A Gly MA	CH_3-CONH-CH_2-CONH-CH_3	19,9
A Gly EA	CH_3-CONH-CH_2-CONH-C_2H_5	21,8
A Ala MA	CH_3-CONH-CH(CH_3)-CONH-CH_3	16,4
A Ala EA	CH_3-CONH-CH(CH_3)-CONH-C_2H_5	19,7

Nous avons ensuite calculé les anisotropies optiques moléculaires théoriques pour toutes les conformations obtenues en faisant varier les angles ϕ et ψ de 5° en 5° entre - 180° et + 180°. Les paramètres géométriques utilisés dans ces calculs proviennent pour la plupart des compilations de SCOTT et SCHERAGA (19) (tableau I) ; certains ont cependant été très légèrement modifiés en tenant compte des résultats de POPOV et coll.(22). Nous les avons rassemblés sur le tableau XVI.

Tableau XVI : Paramètres géométriques des dipeptides modifiés d'après POPOV et coll.(22).

Liaison	Longueur en Å	Angle de liaisons	Valeur
N - H	1,04	$\tau(NC'C_\alpha)$	116°
C_α - H	1,10	$\tau(NC'O)$	123°
C_β - H	1,10	$\tau(NC_\alpha NH)$	115°
		$\tau(HNC')$	122°

Les polarisabilités optiques des différents groupements sont celles du tableau IX. Les lignes "d'isoanisotropie" tracées en utilisant le programme ANISO représentent le lieu des points (ϕ, ψ) associés aux conformations dont l'anisotropie optique moléculaire calculée (γ^2 calc) est égale à la grandeur expérimentale (γ^2 exp), compte tenu du domaine d'incertitude (3 %) (figures 31 et 32). Nous avons représenté sur un même diagramme les lignes homologues d'isoanisotropie des composés A Gly MA et A Gly EA d'une part (fig. 31) et de A Ala MA et A Ala EA d'autre part (fig. 32).

Conformément aux hypothèses de la méthode de perturbation d'anisotropie, les isomères de rotation possibles correspondent nécessairement aux zones du plan ϕ, ψ pour lesquelles les lignes homologues d'isoanisotropie se recouvrent (notées ○ et ◌ sur les figures). On constate que ces lignes sont parfois très proches l'une de l'autre sur de larges domaines du diagramme conformationnel. Cette remarque nous a incité à tester l'influence des petites variations des angles ϕ et ψ sur la valeur de l'anisotropie optique moléculaire. La figure 33 fournit un exemple de la forme des courbes qui représentent la variation de γ^2 en fonction de ψ lorsque ϕ est constant. Elle montre que l'anisotropie optique moléculaire d'un dipeptide est très sensible à une petite variation de l'angle ψ. Cette propriété s'applique également aux fonctions $\gamma^2 = f(\phi)$ à ψ constant. Par ailleurs, lorsque ϕ et ψ varient simultanément, on constate que des lignes d'isoanisotropie très proches (compte tenu de l'épaisseur du trait représentant l'incertitude expérimentale) peuvent correspondre à des valeurs de γ^2 notablement différentes. La figure 34 sur laquelle nous avons représenté les lignes d'isoanisotropie de A Ala MA correspondant à des γ^2 régulièrement espacés, illustre parfaitement ce phénomène.

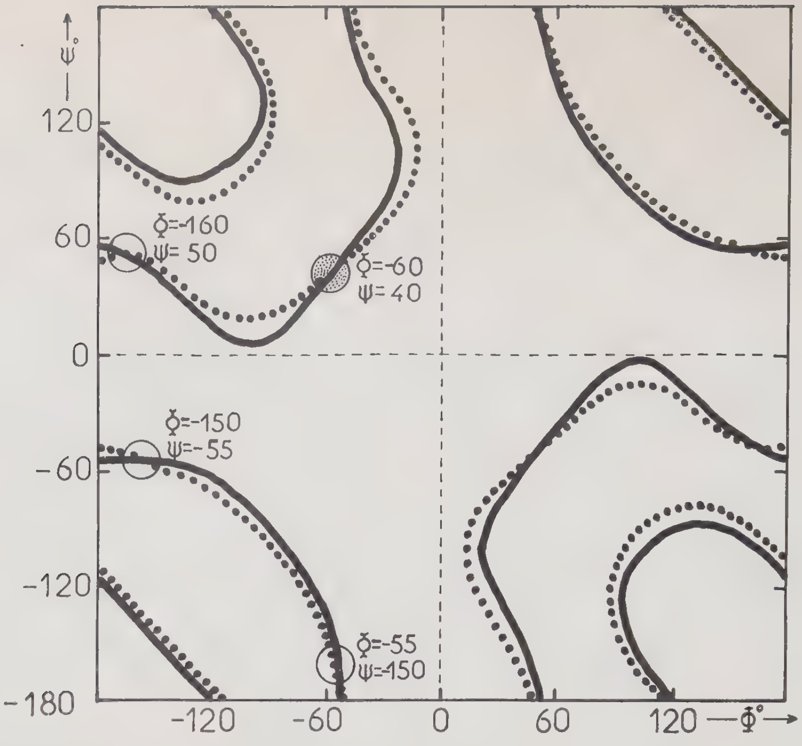


Fig. 31 : Diagramme d'isoanisotropie des dipeptides dérivés de la glycine (R_1 = H).
—— : A Gly MA (γ^2 = 19,9 Å^6)
.... : A Gly EA (γ^2 = 21,8 Å^6)
L'épaisseur du trait tient compte du domaine d'incertitude expérimentale (3 %).

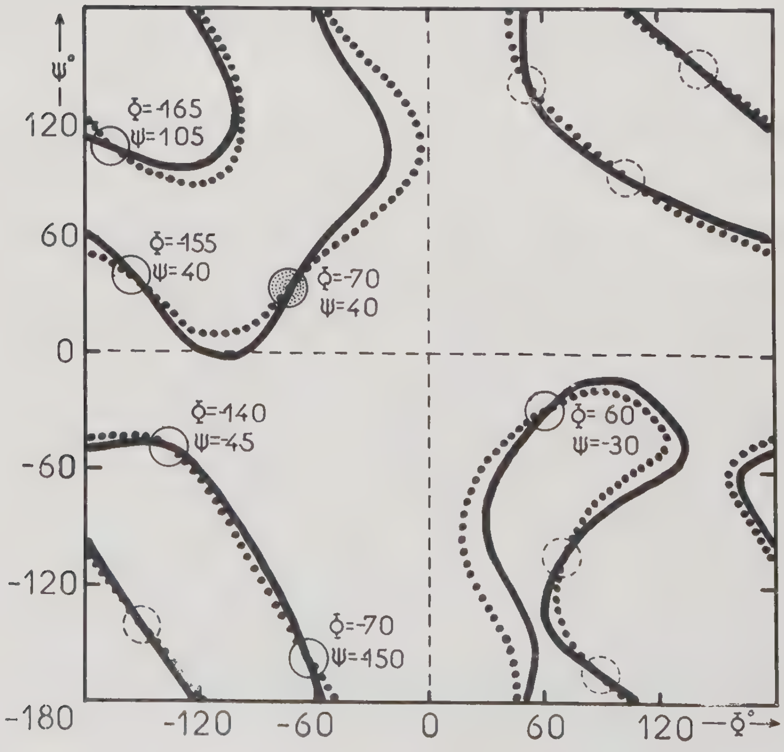


Fig. 32 : Diagramme d'isoanisotropie des dipeptides dérivés de l'alanine (R_1 = CH_3).
—— : A Ala MA (γ^2 = 16,4 Å^6)
.... : A Ala EA (γ^2 = 19,7 Å^6)
L'épaisseur du trait tient compte du domaine d'incertitude expérimentale (3 %).

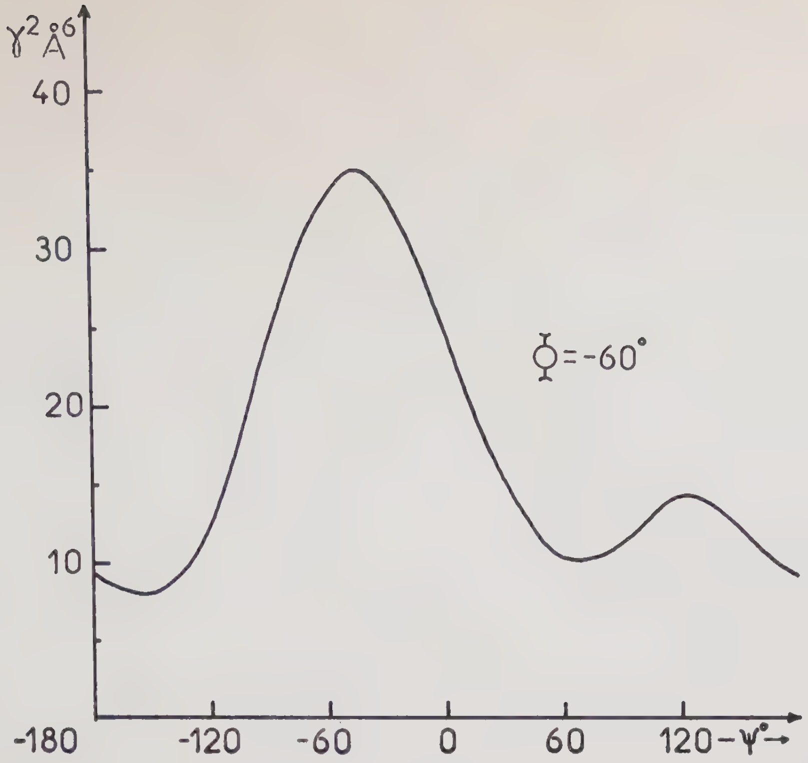


Fig. 33 : Variation de l'anisotropie optique moléculaire (γ^2) de A Gly MA en fonction de l'angle ψ à ϕ constant (Φ = - 60°).

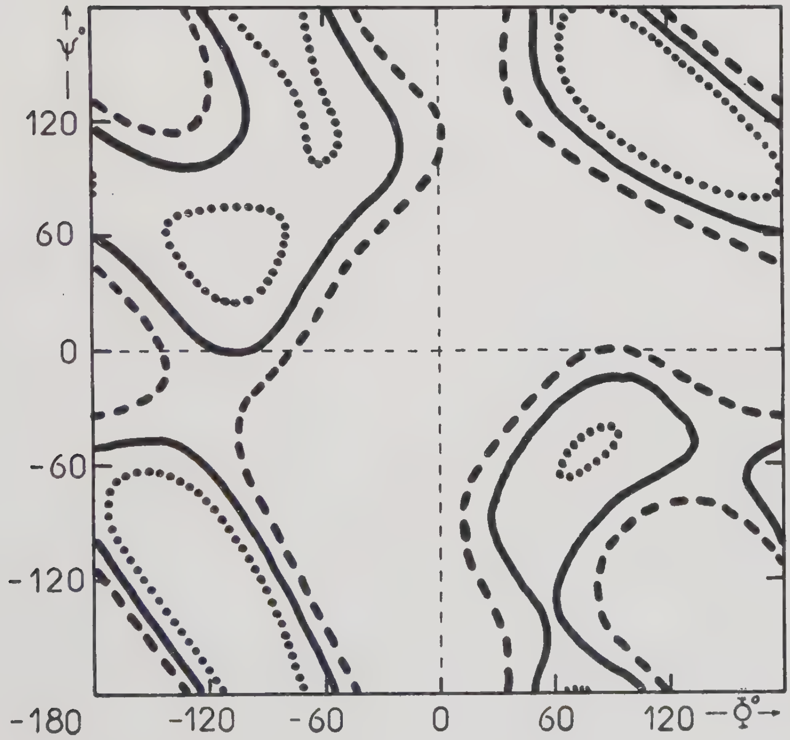


Fig. 34 : Diagrammes d'isoanisotropie de A Ala MA calculés pour trois valeurs de γ^2

.... : γ^2 = 10,5 Å^6

—— : γ^2 = 16,5 Å^6

---- : γ^2 = 22,5 Å^6

l'épaisseur du trait tient compte d'une incertitude de 3 %.

L'ensemble de ces résultats confirme la grande précision que l'on est en droit d'attendre de cette méthode et permet d'exclure de l'espace conformationnel les zones pour lesquelles on n'observe pas de véritables intersections des lignes d'isoanisotropie.

325 - DISCUSSION DES RESULTATS

L'application de la méthode de perturbation ne conduit pas, ainsi que nous venons de le voir, à un résultat unique mais permet de mettre en évidence un petit nombre de conformères possibles. Il convient à présent de comparer leurs propriétés suivant des critères théoriques et expérimentaux afin de sélectionner le plus probable.

Nous avons exclu en premier lieu les formes notées ◌ sur la figure 32 car elles appartiennent à des zones stériquement interdites selon les critères "Hard Sphere" (17, 99) ou se situent à plus de 7 kcal du minimum global dans les diagrammes calculés par PULLMAN et coll.(40). Nous avons ensuite évalué les énergies relatives des autres isomères de rotation possibles en utilisant les résultats des calculs conformationnels semi-empiriques (19, 21, 22) et quantiques (36, 40, 45). Cette comparaison souligne l'accord des deux types de méthode en ce qui concerne la conformation d'énergie minimale située vers $\phi = -60°$, $\psi = 40°$ (fig. 31) pour les dérivés de la glycine (A Gly MA, A Gly EA) et vers $\phi = -70°$, $\psi = 40°$ (fig. 32) pour ceux de l'alanine (A Ala MA, A Ala EA). Nous avons pu confirmer ces informations énergétiques et calculer les moments dipolaires théoriques des isomères correspondant aux intersections des courbes d'isoanisotropie en utilisant l'approximation INDO (Incomplete Neglect of Differential Overlap) de POPLE et coll.(97)*. Les résultats de ce calcul ont permis de classer les isomères possibles par énergie croissante (tableau XVII) et de constater que dans chaque cas la valeur du moment dipolaire de l'isomère le plus stable est relativement élevée. Ce fait était d'ailleurs raisonnablement prévisible dans un solvant de constante diélectrique élevée tel que l'eau. Les deux conformations ainsi sélectionnées pour les dérivés de la glycine et de l'alanine sont très proches l'une de l'autre et correspondent sensiblement à la forme chélatée $C_{7\,eq}$ déjà mise en évidence lorsque ces mêmes composés se trouvent en solution dans le tétrachlorure de carbone ou en matrice d'argon.

---

* Ce calcul a été effectué en collaboration avec Monsieur J.F. LABARRE, Maître de recherche au C.N.R.S..

<u>Tableau XVII</u> : Energies relatives et moments dipolaires des conformations correspondant aux intersections des courbes d'isoanisotropie des figures 30 (A Gly MA, A Gly EA) et 31 (A Ala MA, A Ala EA) calculés selon la méthode I.N.D.O..

Gly			
$\Phi°$	$\psi°$	ΔE Kcal/mole	μ Debye
- 60	40	0	6,23
- 160	50	1,81	5,37
- 150	- 55	2,17	6,94
- 55	- 150	4,59	7,09

Ala			
$\Phi°$	$\psi°$	ΔE Kcal/mole	μ Debye
- 70	40	0	5,19
60	- 30	3,15	6,20
- 165	105	6,67	3,61
- 140	- 45	7,52	7,11
- 70	- 150	11,69	7,12
- 155	40	23,25	5,37

L'existence en milieu aqueux de ce conformère stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire est parfaitement compatible avec les résultats que nous avons obtenus en comparant les spectres infrarouges et Raman de A Gly MA à l'état solide et en solution dans l'eau.

KOYAMA et SHIMANOUCHI (85) ont, en effet, montré que A Gly MA présente à l'état solide deux variétés allotropiques différentes A et B dont les conformations moléculaires sont proches respectivement de l'isomère C_7 ($\phi \simeq -60°$; $60° < \psi < 0°$) et de la forme polyglycine II ($\phi \simeq -60°$; $\psi \simeq 180°$). De plus, ces auteurs ont démontré que l'obtention de ces deux formes était liée au mode opératoire utilisé pour préparer l'échantillon. Ainsi, lorsque A Gly MA est fondu entre deux faces de bromure de potassium, on obtient, après refroidissement, un cristal de la forme B. Si l'on abandonne cet échantillon en atmosphère suffisamment humide, on observe une transition de phase B → A qui devient complète au bout d'environ deux semaines.

Pour notre part, après avoir suivi jour après jour et pour de multiples échantillons l'évolution du spectre infrarouge de A Gly MA au cours de la transition, nous avons pu établir que cette transformation est consécutive à une hydratation du cristal. En effet, on note d'une part, l'apparition d'une large bande

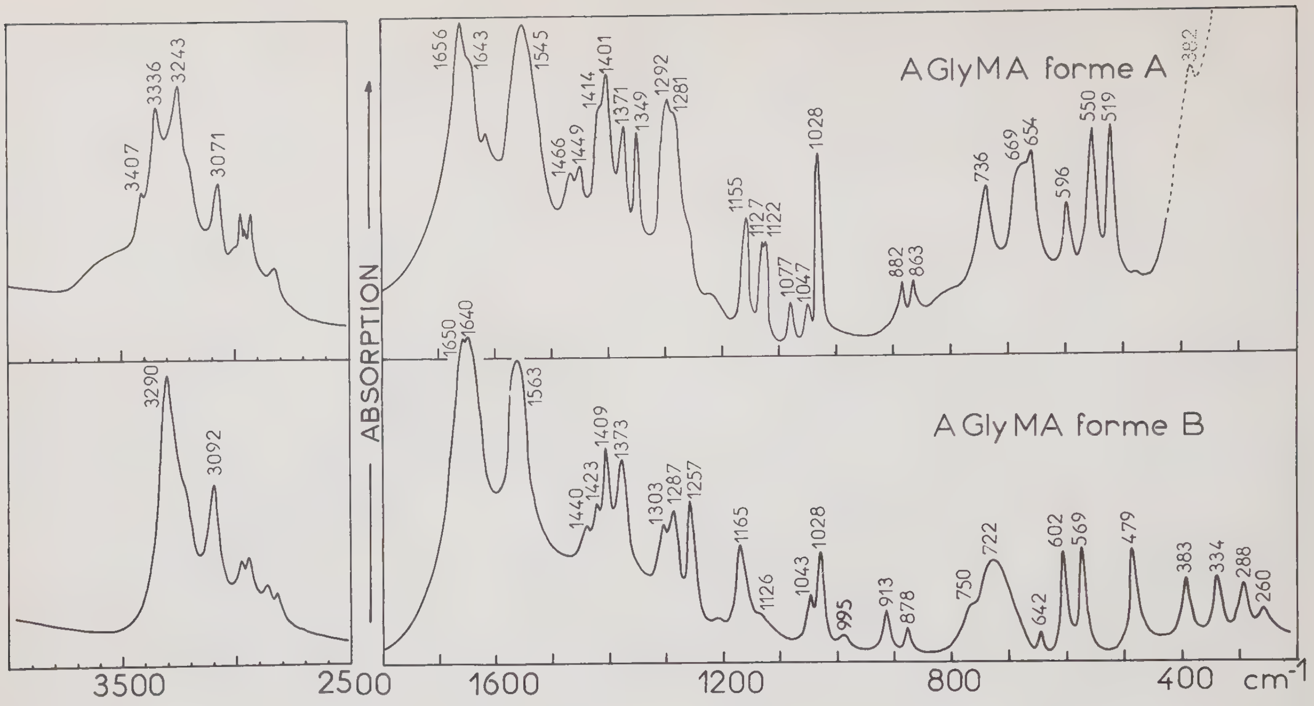


Fig. 35 : Spectres infrarouges de 4000 à 200 cm^{-1} de A Gly MA à l'état solide, formes A et B

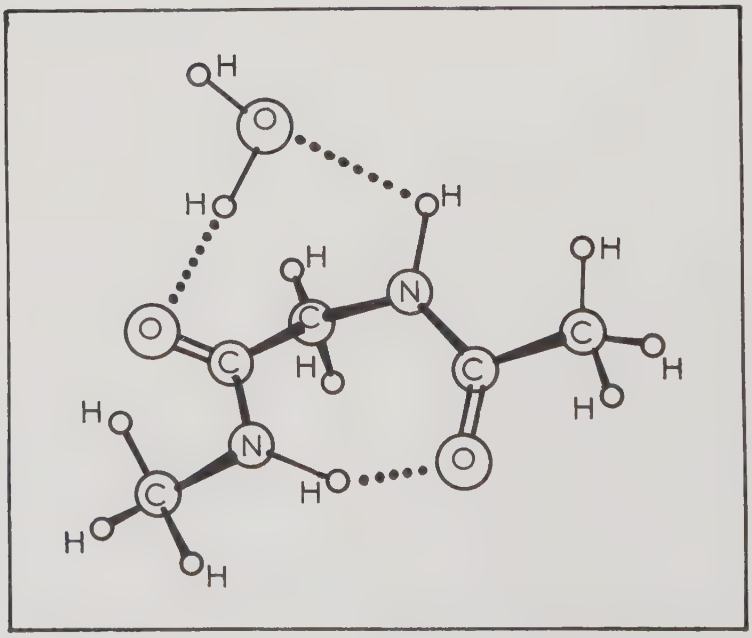


Fig. 36 : Représentation schématique de la conformation C_7 liée à une molécule d'eau.

centrée vers 3500 cm^{-1} caractéristique des échantillons solides hydratés et, d'autre part, un élargissement significatif des absorptions amide II et III. De plus, les modifications spectrales observées lors du passage B → A (fig. 35) s'interprètent sans ambiguité en admettant que les liaisons hydrogène intermoléculaires NH ... O = C du cristal B (type polyglycine II) sont remplacées à la fois par une chélation NH ...O = C de type C_7 et par des liaisons hydrogènes de type C = O ... H (OH) et N-H ... O (H_2) avec l'eau selon le modèle de la figure 36. Ainsi, l'absorption correspondant à la vibration ν(N-H) située vers 3290 cm^{-1} dans la forme B éclate suivant deux composantes vers 3336 et 3243 cm^{-1} dans la forme A, la bande située vers 3407 cm^{-1} étant alors due à la vibration ν(OH) de l'eau liée au groupe carbonyle non chélaté de A Gly MA. Ainsi que nous l'avons déjà signalé, on constate que l'absorption amide II est fortement élargie dans le spectre de la forme A et que sa fréquence est sensiblement plus basse que dans celui de la forme B. On observe le même phénomène pour la bande Amide III. On doit noter également dans cette région la présence de la bande vers 1349 cm^{-1} qui correspond au mouvement W CH_2* alors que cette absorptien est déplacée, dans le spectre de la forme B, par suite d'un couplage significatif de la conformation polyglycine II (83). Ce fait démontre que les angles ψ ont des valeurs très différentes dans les structures A et B. Enfin, on constate, dans la région des bandes amides IV, V et VI une évolution semblable à celle des absorptions ν(NH). Ainsi, par exemple, la bande amide V située vers 722 cm^{-1} dans la forme B donne lieu dans la forme A à deux composantes vers 736 et 669 cm^{-1}. L'ensemble de cette interprétation suggère donc que le cristal de la forme A est constitué de molécules A Gly MA chélatées en C_7 liées chacune à une molécule d'eau.

Nous avons alors comparé le spectre infrarouge de la forme A avec le spectre Raman de la solution aqueuse afin de vérifier l'identité de conformation de A Gly MA dans ces deux milieux comme le suggèrent nos résultats D.R.D. et les considérations théoriques exposées précédemment.

Certes, il eut été plus logique d'effectuer cette comparaison soit entre spectres infrarouges, soit entre spectres Raman. Malheureusement, il nous a été impossible jusqu'à présent d'obtenir le spectre Raman de la forme A avec nos échantillons préparés entre deux faces de bromure de potassium. Par ailleurs, le spectre infrarouge de A Gly MA en solution aqueuse n'est exploitable que dans un domaine spectral très étroit par suite des absorptions larges et intenses dues à l'eau.

Avant d'entreprendre notre analyse comparative, nous avons vérifié la similitude des spectres infrarouges et Raman de A Gly MA en solution aqueuse d'une part (fig. 37) et de A Gly MA solide forme B d'autre part (fig. 35 et 37). Nous avons pu ainsi constater que pour un même échantillon les fréquences des absorptions

---

*W CH_2 : Mouvement de balancement hors du plan.

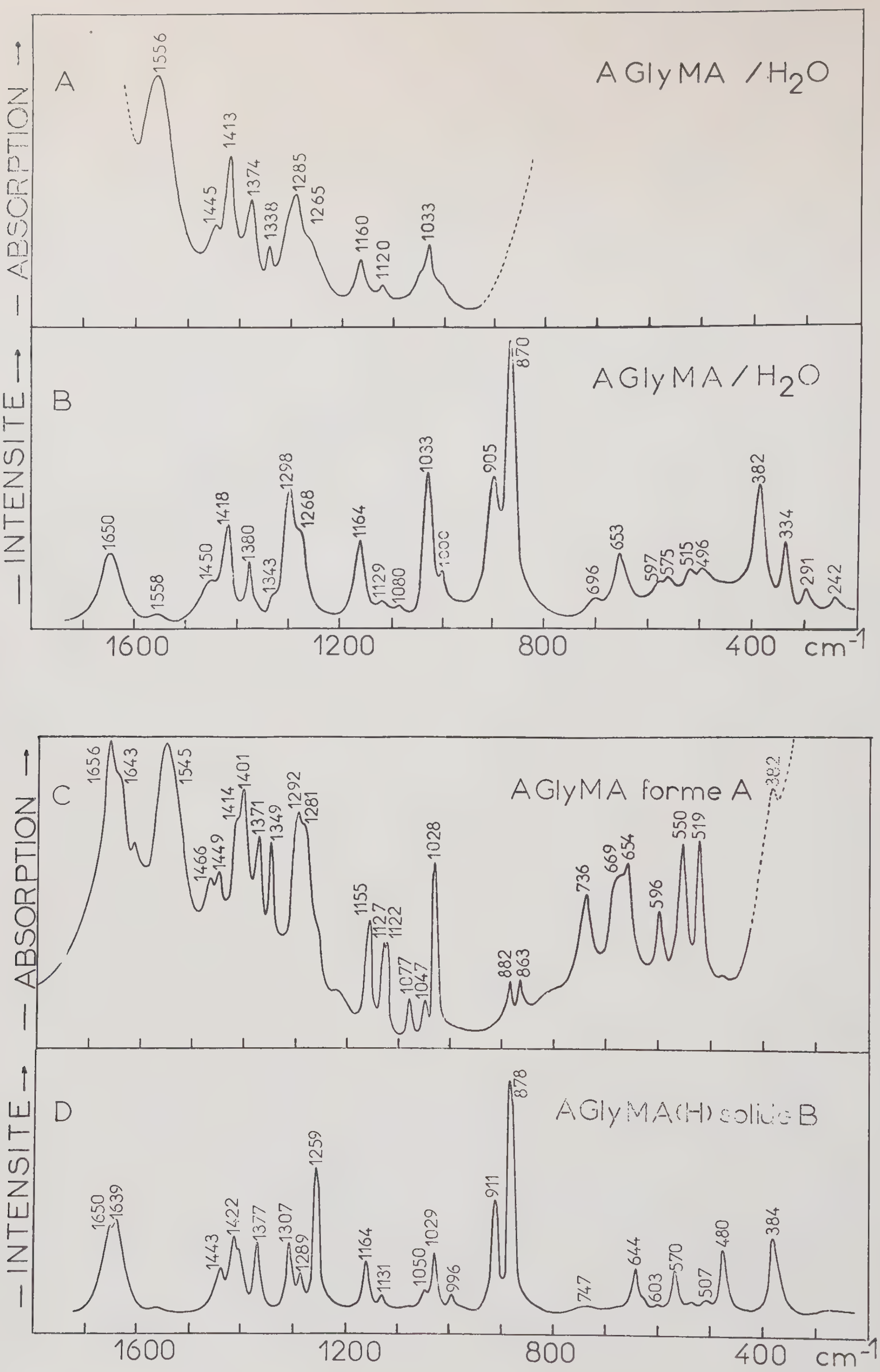


Fig. 37 : Spectres infrarouges et Raman de A Gly MA dans différents états physiques.

A - Spectre infrarouge de A Gly MA en solution aqueuse saturée (film entre deux faces de brome iodure de thallium).

B - Spectre Raman de A Gly MA en solution aqueuse (C ≃ 2 mole/litre).

C - Spectre infrarouge de A Gly MA à l'état solide, forme A.

D - Spectre Raman de A Gly MA à l'état solide, forme B.

infrarouges et des raies Raman sont pratiquement les mêmes, seules les intensités relatives varient, ce qui constitue d'ailleurs un critère d'attribution supplémentaire. Par conséquent, la comparaison du spectre Raman de la solution aqueuse et du spectre infrarouge de la forme A est parfaitement justifiée.

L'examen de la figure 37 fait apparaître une analogie significative de ces deux spectres dans la plupart des domaines réputés sensibles à la conformation. Ainsi, par exemple, dans la région de 1400 à 1200 cm^{-1}, on observe un massif amide III identique et la présence de la bande vers 1345 cm^{-1} correspondant à la vibration W CH_2 non couplée (83). Cette région présente par contre un profil spectral totalement différent dans le spectre de la forme B. On retrouve un phénomène semblable dans la région des absorptions amides IV et VI ainsi que dans celle des mouvements du squelette peptidique.

Bien que cette analyse spectroscopique semble devoir être approfondie, elle nous permet d'ores et déjà de confirmer que A Gly MA (et par conséquent A Gly EA) existe en solution aqueuse sous une forme chélatée proche de l'isomère C_7 liée à une molécule d'eau suivant la représentation schématique de la figure 36. Il est logique de penser qu'il en est de même pour les dipeptides dérivés de l'alanine A Ala MA et A Ala EA dans la conformation C_7 eq ($\phi = - 70°$; $\psi = 40°$) déterminée par D.R.D..

En résumé, l'ensemble des résultats obtenus par D.R.D., spectroscopie infrarouge, diffusion Raman et calculs conformationnels théoriques, a permis de montrer que les dipeptides dérivés de la glycine et de l'alanine existent en solution aqueuse sous la forme chélatée C_7, cette forme étant stabilisée par la liaison intramoléculaire $C_1 = O_1 \ldots H_2 - N_2$ d'une part, et par les liaisons hydrogène $C_2 = O_2 \ldots H$ (OH) et $N_1 - H_1 \ldots O$ (H_2) avec le solvant d'autre part. Dans le cas des dipeptides A Ala MA et A Ala EA, les résultats énergétiques obtenus en utilisant la méthode INDO suggèrent de plus que le radical méthyl est en position équatoriale.

CONCLUSION

L'objet essentiel de ce travail a été l'étude conformationnelle expérimentale des dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 dans différents états physiques en fonction de la nature de la chaîne latérale R_1 et du groupement terminal R_2.

Préalablement à l'exposé de nos résultats expérimentaux, nous avons analysé les méthodes permettant le calcul a priori des énergies conformationnelles relatives aux dipeptides isolés. Leur comparaison fait apparaître des divergences notables quant au nombre et à la localisation des conformations d'énergie minimale : il est probable qu'elles dépendent pour une large part de la façon dont il est tenu compte des liaisons hydrogène intramoléculaires. A cet égard, parmi les méthodes quantiques globales, il semble que le procédé PCILO développé par PULLMAN et coll. soit particulièrement bien adapté à l'étude des systèmes peptidiques.

Expérimentalement, nous avons montré que les dipeptides dissous dans le tétrachlorure de carbone présentent un équilibre conformationnel entre deux formes chélatées, l'une "étendue" ($\phi \simeq -180°$, $\psi \simeq -180°$) et l'autre "repliée" ($\phi \simeq -60°$, $\psi \simeq 40°$). La forme étendue est stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire relativement faible qui s'établit entre les groupes N_1H_1 et C_2O_2 suivant un cycle à cinq chaînons (C_5). La forme repliée présente pour sa part, une liaison hydrogène intramoléculaire forte entre les groupements C_1O_1 et N_2H_2 suivant un cycle à sept chaînons (C_7) dont nous avons également précisé la géométrie. Dans le cas où l'atome de carbone C_α central est asymétrique ($R_1 \neq H$), il a été possible de localiser la position de la chaîne latérale R_1 par rapport au cycle de chélation C_7. L'interprétation de l'abaissement de fréquence observé lorsque le groupement N-H subit un effet de champ de la part du radical aliphatique porté par le carbone α contigu nous a permis de nous prononcer sur l'existence de l'isomère C_7 équatorial. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure d'exclure la forme C_7 axiale.

Nous avons également proposé une méthode de dosage de l'équilibre conformationnel entre les formes "étendue" et "repliée" des dipeptides en solution que nous avons illustrée dans le cas où le solvant est le tétrachlorure de carbone. Cette analyse quantitative est fondée sur la comparaison des coefficients d'extinction molaire des absorptions ν(N-H) correspondant aux différents types de vibrateurs des formes C_5 et C_7 avec celles de molécules modèles présentant l'une ou l'autre de ces formes. Les résultats ainsi obtenus montrent en particulier que les dipeptides possédant une chaîne latérale encombrante ont une tendance plus grande que les autres à présenter la forme chélatée "repliée" C_7.

Les deux formes chélatées C_5 et C_7 ont pu être également observées lorsque les dipeptides sont isolés à basse température en matrice d'argon. Nous avons, à cette occasion, souligné l'intérêt de cette technique pour analyser les structures moléculaires puisqu'il est possible d'obtenir le spectre infrarouge complet de la substance active et de l'étudier dans les meilleures conditions de résolution des absorptions. Grâce à une étude parallèle des molécules modèles A Gly $(EA)_2$ et A Sar EA, nous avons pu attribuer la quasi totalité du spectre infrarouge des dipeptides A Gly MA et A Ala MA et suivre l'évolution des principales bandes "amide" sensibles à la conformation et aux deux modes de chélation C_5 et C_7. De plus, l'interprétation des absorptions dues aus vibrations de valence ν(C'-N) des composés N-deutériés a permis de conclure qu'il n'existait pas dans la matrice de formes semi-étendues sans chélation en plus des isomères C_5 et C_7.

L'utilisation conjointe de la spectroscopie Raman et de la Diffusion Rayleigh Dépolarisée nous a permis d'effectuer l'analyse conformationnelle des dipeptides en solution aqueuse. Les informations obtenues par l'analyse du spectre Raman nous ont suggéré qu'un dipeptide adopte une conformation unique lorsqu'il est dissous dans l'eau, mais se sont montrées insuffisantes pour en préciser les paramètres structuraux. Par contre, la Diffusion Rayleigh Dépolarisée s'est révélée être une méthode particulièrement bien adaptée pour résoudre ce problème. En effet, son principe consiste à rechercher une géométrie permettant l'identification de l'anisotropie optique moléculaire déterminée expérimentalement avec celle que l'on peut calculer en utilisant la théorie de la valence optique. Plusieurs mises au point et tests préalables ont été nécessaires avant de pouvoir utiliser cette méthode pour les systèmes peptidiques. Ainsi, nous avons en premier lieu déterminé les polarisabilités optiques principales du groupement amide O┄C'┄N et établi leur caractère transférable grâce à une comparaison des réfractions molaires des alkylacétamides et des dipeptides. Nous avons ensuite mis à l'épreuve l'ensemble de la méthode en étudiant la conformation du N-éthylacétamide en solution aqueuse.

L'analyse conformationnelle du squelette dipeptidique a été effectuée en interprétant les anisotropies optiques moléculaires des dipeptides dérivés de la glycine et de l'alanine en termes de structure. Nous avons, dans ce but, proposé une méthode de perturbation d'anisotropie permettant de lever partiellement l'indétermination mathématique du problème. Les résultats présentés sous la forme de diagrammes d'isoanisotropie ont ensuite été discutés selon des critères énergétiques et spectroscopiques. Ils montrent que le squelette dipeptidique se trouve en conformation repliée ($\phi \simeq -60°$, $\psi \simeq 40°$) proche de l'isomère C_7 et présente par conséquent la liaison hydrogène intramoléculaire caractéristique de cette forme entre les groupes $C'_1 = O_1$ et $N_2 - H_2$. Cet isomère est, par ailleurs, stabilisé par deux liaisons hydrogène intermoléculaires de type $N_1 - H_1 \ldots O - H$ et $C'_2 = O_2 \ldots H - O$ faisant intervenir la même molécule d'eau.

D'un point de vue très général, l'ensemble de ces résultats est significatif de la grande stabilité des conformations présentant une liaison hydrogène intramoléculaire lorsque le dipeptide est isolé ou en solution. A cet égard, il faut souligner que les caractéristiques géométriques inhabituelles de la chélation C_5 indiquent que la liaison hydrogène $N_1 - H_1 \ldots O_2 = C'_2$ est relativement faible. Ce résultat prouve que ce type d'interaction, même s'il est peu important, peut suffire à stabiliser la molécule lorsque celle-ci se trouve en milieu quasi inerte. Par conséquent, il est possible que des interactions de ce type se retrouvent dans d'autres systèmes peptidiques. Il est également remarquable de constater la persistance de la forme chélatée C_7 en solution dans l'eau en dépit des interactions compétitives avec ce solvant. Il est probable que de telles liaisons hydrogène intramoléculaires entre résidus consécutifs jouent un rôle important dans la stabilisation des structures secondaires des protéines tant fibreuses que globulaires ainsi que dans le fonctionnement de certains sites enzymatiques. Il semble, en effet, d'ores et déjà admis que la structure "cross β" est initiée par une liaison hydrogène de type C_7.

Ce travail confirme, en outre, les grandes possibilités de la spectroscopie infrarouge dans l'analyse conformationnelle des séquences modèles isolées dans un solvant quasi inerte ou piégés à basse température en matrice de gaz rare. Par ailleurs, l'utilisation conjointe de la spectroscopie Raman et la Diffusion Rayleigh Dépolarisée apparait comme une technique particulièrement prometteuse pour l'étude des solutions aqueuses. De plus, le procédé de perturbation d'anisotropie augmente les possibilités offertes par la D.R.D. dans le cas des molécules possédant plusieurs axes de rotation interne.

Il nous semble, au terme de ce mémoire, que l'on dispose là de méthodes d'analyse et de résultats expérimentaux susceptibles de contribuer à une meilleure connaissance de la conformation et par conséquent du mode d'action des séquences peptidiques relativement courts, soit elles-mêmes biologiquement actives, soit in- [illegible] sites actifs de protéines fonctionnelles.

PARTIE EXPERIMENTALE

COMPOSES ET SOLVANTS

Les dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 ainsi que les composés modèles A Sar EA et A Gly $(EA)_2$ ont été synthétisés au laboratoire de chimie organique industrielle de Nancy par NEEL et ses collaborateurs (46). Les alkylacétamides proviennent de la maison Eastman. Avant utilisation et suivant le cas, tous ces produits ont été purifiés par distillations successives ou recristallisation après traitement au noir de carbone jusqu'à élimination complète des impuretés fluorescentes.

La préparation des composés N-deutériés a été effectuée par échanges répétés avec de l'eau lourde en excès. L'eau résiduelle est ensuite évaporée sous vide jusqu'à obtention d'un produit parfaitement sec.

Le tétrachlorure de carbone pour spectrophotométrie "PROLABO" a été desséché par passages sur tamis moléculaires chauds de 4 Å. L'eau préalablement déminéralisée a été distillée dans un évaporateur en quartz avant utilisation. L'eau lourde fournie par le CEA a été employée sans autre purification. L'argon de type N-50 (à 99,999 %) nous a été fourni par la société "L'air Liquide".

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les solutions diluées (5.10^{-4} mole/l > C > 10^{-5} mole/l) dans le tétrachlorure de carbone ont été le plus souvent préparées en boîte sèche. Dans quelques cas, la dissolution des dipeptides très peu solubles a été facilitée par agitation aux ultrasons. Les longueurs de cuves équipées de faces en CaF_2 varient de 5 à 30 cm. Un dispositif optique additionnel a été utilisé dans certains cas pour doubler le trajet optique à travers la cuve d'absorption. Les effets de température ainsi que les expériences réalisées en vue du dosage des formes C_5 et C_7 ont été effectuées à l'aide d'une cuve thermostatée de 10 cm de longueur.

La préparation des échantillons de dipeptides piégés en matrice dans l'argon est décrite en détail par GRENIE (53), aussi nous bornerons-nous ici à rappeler l'essentiel.

La face porte échantillon en iodure de césium est maintenue à une température voisine de 20 K à l'aide d'un échangeur thermique refroidi par circulation du gaz provenant de l'évaporation de l'hélium liquide. La base du polycryostat T.B.T. est munie d'un système à double injection dont les entrées sont orientées à 45° par rapport à la face porte échantillon. Dans l'une des entrées on place le sublimateur dont le chauffage est assuré par une résistance électrique noyée dans de la soudure à l'étain pour homogénéiser la température autour de l'échantillon solide. L'autre entrée sert à injecter le gaz porteur. Son débit est régulé par un robinet à aiguille et mesuré par un débitmètre fonctionnant sur le principe de l'écoulement de Poiseuille d'un gaz à travers un capillaire. La vitesse de dépôt est de l'ordre de quelques millimoles par heure, ce qui correspond généralement à des temps de piégeage de 4 à 6 heures, compte tenu des conditions de dilution que nous avons employées (environ 1 mole de composé pour 300 atomes d'argon).

Les solutions aqueuses utilisées pour effectuer les mesures de D.R.D. et enregistrer les spectres Raman ont été préparées à 25°C en conjuguant les méthodes gravimétriques et volumétriques. Les concentrations des solutions varient dans tous les cas entre 10^{-1} et 2 moles/litre. Ces solutions sont ensuite débarrassées de toutes les particules solides en suspension ("dépoussiérées") dans des cuves "Hellma" en quartz. Pour cela, le dispositif de filtration "Millipore" en acier inoxydable contenant la solution à dépoussiérer est équipé d'une membrane de porosité 100 mµ et placé dans un caisson étanche saturé en vapeur d'eau. On maintient une légère pression d'azote au-dessus de la solution de façon que la cadence de filtration soit comprise entre 3 et 6 gouttes par minute. L'opération consiste alors à recycler autant de fois que nécessaire la solution de la cellule dans l'appareil à filtration jusqu'à obtention d'une solution optiquement pure. Pour vérifier que le dépoussiérage est correct, on place la cellule dans le faisceau de l'arc électrique. On examine alors la solution à l'aide d'une loupe suivant la direction perpendiculaire à celle de la lumière incidente.

Les échantillons solides cristallisés ont été étudiés suivant la région du spectre infrarouge examinée en suspension dans le "Nujol" ou le "Fluorolube" entre deux faces d'iodure de césium.

APPAREILLAGE

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un appareil à réseau Perkin Elmer 225. Les fréquences d'absorption sont lues à ± 1 cm^{-1} dans tout le domaine spectral. Lorsqu'une précision plus grande est requise les bandes sont pointées par interpolation par rapport aux raies de vibration-rotation de gaz de référence (98).

Les spectres Raman ont été enregistrés entre 200 et 1800 cm^{-1} au moyen d'un spectromètre CODERG, PH1 muni d'un laser "Spectra Physics" Hélium/Néon (λ = 6328 Å). Les intensités dépolarisées diffusées ont été mesurées à 25°C à l'aide d'un gammadiffusomètre réalisé au laboratoire (58) et fonctionnant à la longueur d'onde de la raie verte du mercure : λ = 5460 Å (l'intensité dépolarisée diffusée par le cyclohexane = $23,15.10^{-8}$ cm^{-1}). Dans ces conditions, la précision des mesures est comprise entre 1 et 3%.

L'indice de réfraction des solutions a été mesurée à la même longueur d'onde (λ = 5460 Å) grâce à un réfractomètre de BELLINGHAM thermostaté à 25,0 ± 0,1°C

Les calculs des diagrammes d'isoanisotropie ont été effectués sur ordinateur IBM 360/44 au moyen du programme ANISO mis au point au laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1) L. PAULING, R.B. COREY et H.R. BRANSON - Proc. Natl. Acad. Sci. US 37, 205, 241 (1951).

2) M.F. PERUTZ, H. MUIRHEAD, J.M. COX et L.C.G. GOAMAN, Nature 219, 131 (1968).

3) C.C.F. BLAKE, G.A. MAIR, A.C.T. NORTH, D.C. PHILLIPS et V.R. SARMA, Proc. Roy. Soc. (London) B 167, 365 (1967).

4) C.B. ANFINSEN, Harvey Lectures, Series 61, Acad Press, New-York (1967).

5) S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI, T. SUGITA, E. KATO et E. KONDO, J. Amer. Chem. Soc., 73, 1330 (1951).

6) S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI et R. SOUDA, J. Amer. Chem. Soc. 74, 270 (1952).

7) S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI, T. SUGITA, K. KUROSAKI, N. MATAGA et R. SOUDA, J. Amer. Chem. Soc. 74, 4639 (1952).

8) S.I. MIZUSHIMA, M. TSUBOI, T. SHIMANOUCHI, T. SUGITA et T. YOSHIMOTO, J. Amer. Chem. Soc., 76, 2479 (1954).

9) S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI et T. ARAKAWA, J. Amer. Chem. Soc., 79, 5357 (1957).

10) M. TSUBOI, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA, J. Amer. Chem. Soc., 81, 1406 (1959).

11) S.L. PORTNOVA, V.F. BYSTROV, V.I. TSETLIN, V.T. IVANOV et Y.A. OVCHINNIKOV, Zh. Obshch. Khim. 38, 428 (1968).

12) V.F. BYSTROV, S.L. PORTNOVA, V.I. TSETLIN, V.T. IVANOV et Y.A. OVCHINNIKOV Tetrahedron, 25, 493, (1968).

13) Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB - J. Mol. Biol. 52, 1, (1970).

14) J.T. EDSALL, P.J. FLORY, J.C. KENDREW, A.M. LIQUORI, G. NEMETHY, G.N. RAMACHANDRA et H.A. SCHERAGA - J. Biol. Chem., 241, 1004 (1966).

15) L. PAULING - "The nature of the Chemical bond" - Cornell University Press, Ithaca (N.Y.) (1960).

16) H.A. SCHERAGA - Adv. Phys. Org. Chem., 6, 103 (1968).

17) S.J. LEACH, G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA - Biopolymers 4, 369 (1966).

18) P. DE SANTIS, P. GIGLIO, A.M. LIQUORI et A. RIPAMONTI - Nature 206, 456 (1965).

19) R.A. SCOTT et H.A. SCHERAGA - J. Chem. Phys., 45, 2091 (1966).

20) T. OOI, R.A. SCOTT, G. VANDERKOOI et H.A. SCHERAGA - J. Chem. Phys., 46, 4410 (1967).

21) D.A. BRANT, W.G. MILLER et P.J. FLORY - J. Mol. Biol. 23, 47 (1967).

22) E.M. POPOV, G.M. LIPKIND, S.F. ARKHIPOVA et V.G. DASHEVSKII - Mol. Biol. 2, 622 (1968).

23) G.N. RAMACHANDRAN et V. SASISEKHARAN - Adv. Protein Chem. 23, 283 (1968).

24) F. LONDON - Trans.Faraday. Soc. 8, 33 (1937).

25) K.S. PITZER - Adv. Chem. Phys., 2, 59 (1959).

26) R.A. SCOTT et H.A. SCHERAGA - J. Chem. Phys., 42, 2209 (1965).

27) J. KETELAAR - "Chemical constitution" p. 91 Elsevier, Publ. Co. Amsterdam (1953).

28) D.R. HERSCHBACH - "Bibliography for Hindered Internal Rotation and Microwave Spectroscopy" Lawrence Radiation Laboratory, University of California Berkeley (1962).

29) J.A. SCHELLMAN et C. SCHELLMAN - "The Protein" (H. Neurath Ed.) Vol. 2 Academic Press New-York (1966).

30) D.A. BRANT et P.J. FLORY - J. Am. Chem. Soc., 87, 2791 (1965).

31) W.H. STOCKMAYER - J. Chem. Phys., 9, 398 (1941).

32) E.R. LIPPINCOTT et R. SCHROEDER - J. Chem. Phys., 23, 1099 (1955).

33) W.G. MOULTON et R.A. KROMHOUT - J. Chem. Phys., 25, 34 (1956).

34) R. HOFFMANN - J. Chem. Phys., 40, 2474, 2480, 2745 (1964).

35) R. HOFFMANN et A. IMAMURA - Biopolymers 7, 207 (1969).

36) F.A. MOMANY, R.F. Mc GUIRE, J.F. YAN et H.A. SCHERAGA - J. Phys. Chem., 75, 2286 (1971).

37) R. ROSSI, C.W. DAVID et R. SCHOR - J. Phys. Chem., 74, 4551 (1970).

38) J.A. POPLE et G.A. SEGAL - J. Chem. Phys., 44, 3289 (1966).

39) S. DINER, J.P. MALRIEU et P. CLAVERIE - Theor. Chim. Acta, 13, 1 (1969).

40) B. MAIGRET, B. PULLMAN et M. DREYFUS - J. Theor. Biol., 26, 321 (1970).

41) B. MAIGRET, B. PULLMAN et D. PERAHIA - Biopolymers, 45, 107 (1971).

42) B. PULLMAN, B. MAIGRET et D. PERAHIA - Theor. Chim. Acta., 18, 44 (1970).

43) B. MAIGRET, D. PERAHIA et B. PULLMAN - J. Theor. Biol. 29, 275 (1970).

44) D. PERAHIA, B. MAIGRET et B. PULLMAN - Theor. Chim. Acta, 19, 121 (1970).

45) B. MAIGRET, B. PULLMAN et D. PERAHIA - J. Theor. Biol., 31, 269 (1971).

46) M. AVIGNON, P.V. HUONG, J. LASCOMBE, M. MARRAUD et J. NEEL - Biopolymers 8, 69 (1969).

47) R.A. NYQUIST - Spectrochim. Acta 19, 509 (1963).

48) M. OKI et H. IWAMURA - Bull. Chem. Soc. Japan 32, 950 (1959).

49) G.M. CRIPPEN et H.A. SCHERAGA - Proc. Natl. Acad. Sci. 64, 42 (1969).

50) B. PULLMAN - Coll. Internat. C.N.R.S., 195, 261 (1970).

51) T.S. HERMANN et S.R. HARVEY - Appl. Spectr. 23, 435 (1969).

52) A.J. BARNES et H.E. HALLAM - Quat. Rev. 23, 392 (1969).

53) Y. GRENIE - Thèse Bordeaux C.N.R.S. n° AO 5464 (à paraître).

54) H.F. SHURVELL et K.B. HARVEY - Can. Spectr. 14, 32 (1969).

55) L. SALEM - Fondements Théoriques des Recherches sur les actions intermoléculaires - Coll. Internat. C.N.R.S. (1965).

56) F. FILLAUX et C. DE LOZE - J. Chim. Phys., 69,36, (1972).

57) A. THEORET, Y. GRENIE et C. GARRIGOU-LAGRANGE - J. Chim. Phys., 66, 1196 (1969).

58) Brevet C.N.R.S. France n° 102 348 (1967) Fabriquant : Electronique Appliquée 33 - GRADIGNAN (France).

59) R. LOCHET, A. MASSOULIER et R. ROUSSET - Cahiers de Physique 71-72, 63 (1956).

60) C. CLEMENT, Thèse n° 136 Bordeaux (1962).

61) E.H. MEYER et G. OTTERBEIN - Z. Phys. 32, 290 (1931).

62) P. BOTHOREL, J. Colloid. Sci. 27, 529 (1968).

63) E.V. CHALAM - Proc. Indian. Acad. Sci., A 15, 190 (1942).

64) R.P. SMITH et E.M. MORTENSEN - J. Chem. Phys. 34, 714 (1961).

65) G. FOURCHE - J. Chim. Phys. 65, 1500 (1968).

66) P. FOULANI et C. CLEMENT - Bull. Soc. Chim. 450 (1970).

67) A. CARISTAN, H. BODOT et P. BOTHOREL - Bull. Soc. Chim. 2589 (1969).

68) P. BOTHOREL, C. CLEMENT et P. MARAVAL - C.R. Acad. Sci., 264 C, 568 (1967).

69) G. RICHOUX et C. CLEMENT - J. Chim. Phys. (sous presse).

70) C. CLEMENT (Communication privée).

71) A. CARISTAN, P. BOTHOREL et H. BODOT - J. Chim. Phys. 66, 1009 (1969).

72) T. MIYAZAWA, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA - J. Chem. Phys. 29, 611 (1958).

73) J.L. KATZ et B. POST - Acta Crystallog. 13, 624 (1960).

74) E.M. BRADBURY et A. ELLIOT - Spectrochim. Acta 19, 995 (1963).

75) E.M. POPOV, V.G. DASHEVSKII, G.M. LIPKIND et S.F. ARKHIPOVA - Mol. Biol. 2, 612 (1968).

76) M. REY-LAFON, J. LASCOMBE et M.L. JOSIEN - Ann. Chim. 8, 493 (1963).

77) L.A. LAPLANCHE et M.T. ROGERS - J. Amer. Chem. Soc. 86, 337 (1964).

78) J. JAKES et S. KRIMM - Spectrochim. Acta 27 A, 19 et 35 (1971).

79) R.A. RUSSEL et H.W. THOMSON - Spectrochim. Acta 8, 138 (1956).

80) M. REY-LAFON, M.T. FOREL et C. GARRIGOU-LAGRANGE - Spectrochim. Acta (sous presse).

81) C. ROMERS et J.E.G. GREUTZBERG - Rec. Trav. Chim. 75, 331 (1956).

82) M. MARRAUD, J. NEEL, M. AVIGNON et P.V. HUONG - J. Chim. Phys. 67, 959 (1970).

83) M. AVIGNON et C. GARRIGOU-LAGRANGE - Spectrochim. Acta. 27A, 297 (1971).

84) M. AVIGNON, C. GARRIGOU-LAGRANGE et P. BOTHOREL - J. Chim. Phys. 69, 64 (1972).

85) Y. KOYAMA et T. SHIMANOUCHI - Biopolymers 6, 1037 (1968).

86) Y. KOYAMA, T. SHIMANOUCHI, M. SATO et T. TATSUNO - Biopolymers 10, 1059 (1971).

87) M. SMITH, A.G. WALTON et J.L. KOENIG - Biopolymers 8, 29 (1969).

88) P. SUTTON et J.L. KOENIG - Biopolymers 9, 615 (1970).

89) J.W. SMITH "Electric Dipole Moments" Butterworth Scientific Publications London (1955).

90) C.P. SMYTH "Dielectric Behaviour and Structure" Mc Graw Hill, New-York (1955).

91) K.G. DENBIGH - Trans. Faraday Soc. 936 (1940).

92) K.G. DENBIGH et B.C. VICKERY - Trans. Faraday. Soc. 61 (1949).

93) J. GRANGE et H. FOUSSE - Cahiers de Physique 128, 183 (1961) et 137, 35 (1962).

94) C. CLEMENT - C.R. Acad. Sci., 255, 863 (1962).

95) C. CLEMENT et P. BOTHOREL - J. Chim. Phys., 1262 et 1282 (1964).

96) C. CLEMENT - C.R. Acad. Sci. 264, 1228 (1967).

97) J.A. POPLE, D.L. BEVERIDGE et P.A. DOBOSH - J. Chem. Phys., 47, 2026 (1967).

98) Tables of Wavenumbers for the Calibration of Infrared Spectrophotometers Ed. I.U.P.A.C., Butterworth, London (1961).

99) G.N. RAMACHANDRAN, C. RAMAKRISHNAN et V. SASISEKHARAN - J. Mol. Biol. 7, 95 (1963).

100) P.K. PONNUSWAMY et V. SASISEKHARAN - Biopolymers 10, 565 (1971).

101) B. MAIGRET, D. PERAHIA et B. PULLMAN - Biopolymers 10, 491 (1971).

102) G.M. LIPKIND, S.F. ARKHIPOVA et E.M. POPOV - Izv. Akad. Nauk. S.S.S.R. Ser Khim, 315 (1970).

Vu et approuvé

Bordeaux, le

Le Président de l'Université
de Bordeaux I

Imprimerie du C.R.P.P.

33 - TALENCE

- 1972 -